

Institut für Molekulare Mechanismen bei Krankheiten  
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet et phil. II Michael Hottiger

---

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)  
Leitung: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von  
Dr. med. vet. Karina Klein, DVM-PhD

**Entwicklung eines Tiermodells für eine akute Osteomyelitis im Schaf**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

**Katharina Siwy**

Tierärztin  
aus Herdecke (Deutschland)

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin

PD Dr. med. Yvonne Achermann, Korreferentin

**2020**



Für Bella und Petzi



<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>9</b>
<b>Summary.....</b>	<b>10</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>11</b>
1.1 Problemstellung.....	11
1.2 Zielsetzung der Arbeit.....	11
1.3 Versuchsanordnung.....	11
<b>2 Literaturübersicht .....</b>	<b>13</b>
2.1 Osteomyelitis und Implantat-assoziierte Infektionen als wachsende Herausforderung .....	13
2.2 Die Infektion des Knochens und die biologischen Auswirkungen .....	14
2.3 Osteomyelitiserreger .....	16
2.4 Conditioning Film und Bakterienadhäsion an der Implantatoberfläche .....	16
2.5 Biofilm .....	17
2.6 Prävention und Therapie .....	17
2.7 Die Magnetfeldtherapie nach dem Kraus- Lechner- Verfahren.....	18
2.8 Tiermodell .....	20
2.8.1 Anforderungen an ein Tiermodell.....	20
2.8.2 Tiermodelle für Osteomyelitis .....	21
2.8.3 Schaf als Osteomyelitis Tiermodell.....	22
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
3.1 Aufbau der Studie .....	23
3.1.1 Geplante Pilotphase .....	23
3.1.2 Geplante Hauptphase .....	23
3.1.3 Umgesetzte Studie .....	24
3.2 Bakterien .....	24
3.3 Biosafety .....	26
3.4 Tiere .....	27
3.5 Vorbereitung .....	27
3.6 Operation.....	28
3.6.1 Operationsvorbereitung .....	28
3.6.2 Anästhesie.....	28

3.6.3	Chirurgischer Eingriff .....	29
3.7	Magnetfeldtherapie der Kontroll- und Behandlungsgruppe .....	32
3.7.1	Invasive Komponente .....	32
3.7.2	Nicht-invasive Komponente .....	33
3.8	Therapiebegleitende Maßnahmen .....	34
3.8.1	Klinische Untersuchung .....	34
3.8.2	Postoperative Schmerzmedikation .....	35
3.8.3	Blutuntersuchung .....	36
3.8.4	Röntgenaufnahmen .....	36
3.9	Euthanasie .....	37
3.10	Probengewinnung und Auswertung .....	37
3.10.1	Probengewinnung und Aufbereitung der bakteriologischen Proben .....	37
3.10.2	Bakteriologische Quantifizierung .....	38
3.10.3	Probengewinnung und histologische Aufbereitung .....	40
3.11	Histologische Auswertung .....	41
3.12	Statistik .....	41
<b>4</b>	<b>Resultate .....</b>	<b>42</b>
4.1	Anästhesie .....	42
4.1.1	Anästhesie Pilotphase-1 .....	42
4.1.2	Anästhesie Pilotphase-2 .....	42
4.1.3	Anästhesie Pilotphase-3 .....	42
4.2	Operativer Eingriff .....	42
4.2.1	Operativer Eingriff Pilotphase-1 .....	42
4.2.2	Operativer Eingriff Pilotphase-2 .....	43
4.2.3	Operativer Eingriff Pilotphase-3 .....	43
4.3	Postoperatives Management .....	44
4.3.1	Postoperatives Management Pilotphase-1 .....	44
4.3.2	Postoperatives Management Pilotphase-2 .....	44
4.3.3	Postoperatives Management Pilotphase-3 .....	44
4.4	In-Life-Phase und Medikation .....	44
4.4.1	In-Life-Phase und Medikation Pilotphase-1 .....	44
4.4.2	In-Life-Phase und Medikation Pilotphase-2 .....	46
4.4.3	In-Life-Phase und Medikation Pilotphase-3 .....	48
4.5	Blutanalyse Auswertung .....	49

4.5.1	Blutanalyse Auswertung Pilotphase-1 .....	49
4.5.2	Blutanalyse Auswertung Pilotphase-2 .....	49
4.5.3	Blutanalyse Auswertung Pilotphase-3 .....	50
4.6	Röntgen .....	50
4.6.1	Röntgen Auswertung Pilotphase-1 .....	50
4.6.2	Röntgen Auswertung Pilotphase-2 und -3 .....	50
4.7	Euthanasie .....	51
4.7.1	Euthanasie Pilotphase-1 .....	51
4.7.2	Euthanasie Pilotphase-2 und -3 .....	51
4.8	Makroskopische Beurteilung .....	52
4.8.1	Makroskopische Beurteilung Pilotphase-1 .....	52
4.8.2	Makroskopische Beurteilung Pilotphase-2 .....	53
4.8.3	Makroskopische Beurteilung Pilotphase-3 .....	53
4.9	Bakterien Ergebnisse .....	54
4.10	Auswertung der Histologie .....	54
4.10.1	Histologische Auswertung Pilotphase-1 .....	55
4.10.2	Histologische Auswertung Pilotphase-2 .....	58
4.10.3	Histologische Auswertung Pilotphase-3 .....	60
4.11	Zusammenfassung Resultate und resultierende Entscheidung .....	63
4.11.1	Fazit Pilotphase-1 .....	63
4.11.2	Fazit Pilotphase-2 .....	65
4.11.3	Fazit Pilotphase-3 .....	66
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>67</b>
5.1	Zielstellung und Erkenntnisse .....	67
5.1.1	Tiermodell .....	67
5.1.2	Lokale akute Osteomyelitis .....	70
5.1.3	Befunderhebung und Auswertung .....	74
5.1.4	Effekt PEMF .....	77
5.2	Perspektive .....	78
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>88</b>

**Danksagung.....**

**Curriculum Vitae .....**



## Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, ein standardisiertes Tiermodell zur Induktion einer lokalisierten, akuten *Staphylococcus aureus* Knocheninfektion mit Implantaten bei Schafen zu etablieren und Grundannahmen (Effekt auf Keimwachstum und Gewebe) zur Wirksamkeit der pulsierenden elektromagnetischen Feldtherapie (PEMF) hierauf zu erproben.

Sechs Schafe wurden paarweise operiert. Die Operationsmethode, Defektlokalisationen (Tibia/Femur) sowie Inokula Konzentration wurden fortwährend kritisch geprüft und optimiert. Das Gewebe an der Defektlokalisation sowie die Implantate wurden nach Euthanasie der Versuchstiere zur bakteriellen Quantifizierung und histologischen Analyse ausgewertet. Alle erlangten Auswertungsergebnisse bestätigten den klinischen Befund einer lokalen Knochen- und Weichteilinfektion, die sich im Einklang mit den Anforderungen an das Tierwohl aufrechterhalten liessen. Die Überprüfung der PEMF bestätigte die Grundannahmen nicht.

Es wurden standardisierte Methoden der chirurgischen Inokulation, des In-Life-Monitoring und der quantitativen und semi-quantitativen Ex-vivo-Bewertung bakterieller Infektionen erfolgreich etabliert. In der Zukunft könnte dieses Modell genutzt werden, um das therapeutische Potenzial neuartiger Behandlungen bakterieller Herausforderungen mit Implantaten wie Osteomyelitis zu untersuchen.

Schlüsselwörter: Tiermodell, Osteomyelitis, PEMF, Schaf

---

## Summary

The aim of this study was to establish a standardized animal model for the induction of localized, acute *Staphylococcus aureus* bone infection of implants in sheep and to test basic assumptions (effect on germ count and tissue) on the efficacy of pulsed electromagnetic field therapy (PEMF).

Six sheep were operated in pairs. The surgical method, defect localization (tibia/femur) and inocula concentration were continuously critically reviewed and optimized. The tissue at the defect location as well as the implants were evaluated after sacrifice of the experimental animals for bacterial quantification and histological analysis. All results confirmed the clinical findings of local bone and soft tissue infection, which could be maintained in accordance with animal welfare requirements. The review of the PEMF did not confirm the basic assumptions.

Standardized methods of surgical inoculation, in-life monitoring and ex-vivo quantitative and semi-quantitative assessment of bacterial infection were successfully established.

In the future, this model could be used to investigate the therapeutic potential of novel treatments of bacterial challenges with implants such as osteomyelitis.

Keywords: animal model, sheep, osteomyelitis, PEMF

# 1 Einleitung

## 1.1 Problemstellung

Die Erforschung der Osteomyelitis, die durch offene Frakturen und Implantat assoziierte Infektionen hervorgerufen werden, ist dringend vonnöten. Ein standardisiertes Tiermodell für Implantat assoziierte Osteomyelitis ist derzeit jedoch noch nicht etabliert worden. Der Nutzen eines solchen Modells für die Osteomyelitis-Forschung wäre enorm, da eine Osteomyelitis nur schwer ausreichend therapierbar ist, häufig rezidiert und das steigende Problem mit antibiotikaresistenten pathogenen Keimen nach alternativen und weiteren Therapiemöglichkeiten verlangt.

## 1.2 Zielsetzung der Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit sollte eine Knocheninfektion im Schafmodell ausgelöst werden, um das Magnetodyn® Verfahren zu testen. Das Verfahren wird bereits erfolgreich in der Humanmedizin zur Knochenheilung (1) eingesetzt. Im vorliegenden Experiment sollte nach Etablierung eines Tiermodelles evaluiert werden, welche Auswirkungen die invasive und nicht-invasive Magnetfeldtherapie auf eine subklinische Knocheninfektion mit dem Erreger *S. aureus* hat.

## 1.3 Versuchsanordnung

Vorgesehen war hierzu ursprünglich eine Versuchsanordnung mit zwei Pilotphasen mit 6 Tieren zur Etablierung der nachfolgenden Hauptstudie mit 12 Tieren.

Die erste Pilotphase sollte zwei Wochen und die zweite Pilotphase vier Wochen andauern, um die geeignete *S. aureus* Konzentration für eine lokale akute Osteomyelitis zu ermitteln. Nach der Ermittlung der geeigneten *S. aureus* Konzentration sollte die Hauptphase über einen Zeitraum von vier Wochen und insgesamt zwölf Versuchstieren stattfinden. In der Hauptphase waren sechs Schafe für die Kontrollgruppe und sechs Schafe für die Therapiegruppe geplant.

Nach dem Untersuchungsintervallen sollten die Tiere euthanasiert, die gewonnen Proben makroskopisch beurteilt, aufbereitet, radiologisch und histologisch untersucht und eine bakteriologische Quantifizierung aller Proben durchgeführt werden.

---

Auf Basis in den Pilotphasen der gewonnenen Erkenntnisse wurde die gesamte Versuchsanordnung sukzessive angepasst, sodass das Tiermodell etabliert und sowohl klinisch wie ethisch für die Tiere zumutbar war.

Aufgrund des mangelnden Nachweises eines positiven Effektes der Magnet Therapie auf die Bekämpfung der akuten Knocheninfektion, wurde jedoch auf die Durchführung der Hauptstudie vorerst verzichtet.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Osteomyelitis und Implantat-assoziierte Infektionen als wachsende Herausforderung**

Der medizinische Fortschritt ermöglicht den Menschen immer mehr Möglichkeiten, ihre Lebensqualität z.B. im hohen Alter, nach traumatischen Sport-/Unfällen oder nach sogenannten „Alterskrankheiten“ lange zu erhalten oder wiederzuerlangen (2, 3). Die verbesserten Behandlungs- und Therapiemaßnahmen sind einer der Hauptgründe für diese Möglichkeiten. Der Einsatz von Gelenkprothesen, Herzschrittmachern oder arthroskopischen Operationen (OP) sind nur einige Beispiele der am Häufigsten durchgeführten Operationen unserer Zeit. Global stieg die Zahl der orthopädischen Operationen in den Jahren von 2009-2016 um 7,4 Prozent (4, 5). Unter Berücksichtigung einer steigenden Lebenserwartung (5-7) (durch die fortgeschrittene Medizin und die verbesserten Lebensbedingungen) wird prognostiziert, dass sich in den USA die Anzahl der eingesetzten Implantate sich bis 2030 weiterhin verdoppeln wird (5). Hierbei sollte erwähnt werden, dass der Anteil an Risikopatienten sich dabei ebenso erhöhen wird. Darunter fallen beispielsweise ältere, multimorbide, übergewichtige und rauchende Patienten (3, 8). Eine erhöhte Anzahl an Operationen lässt aber auch folglich eine steigende Anzahl an etwaigen Komplikationen vermuten (9). Ein allgemeines Operationsrisiko dabei ist postoperative Infektion im Zusammenhang mit geschlossenen oder offenen Frakturen und bei Einsatz von Implantaten (10-12). Die Folgen einer Knocheninfektion tragen die Patienten, zum Beispiel in Form von Einschränkungen im Alltag durch sehr lange Behandlungszeiträume (durchschnittlich 6-12 Wochen), längere Krankenhausaufenthalte, Verschlechterung der Lebensqualität (6) bis hin zur Amputation einer Gliedmasse. Auf der anderen Seite trägt die Gesellschaft hingegen die steigenden Kosten, die damit für das Gesundheitssystem verbunden sind (13, 14). Dazu kommt, dass der Therapieerfolg einer fortgeschrittenen Osteomyelitis nur mäßig ist und die moderne Medizin zusätzlich vor dem immer größer werdenden Problem der antibiotikaresistenten pathogenen Keimen steht (15, 16). Es bedarf deshalb dringend alternativer und unterstützender Therapiemöglichkeiten, um orthopädische Infektionen insbesondere nach Operationen mit Implantat-Einsatz zu vermeiden oder zu behandeln. Dieses Ziel vor Augen, forschen und arbeiten Wissenschaftler und Orthopäden zusammen, um gängige Osteomyelitis Therapiemethoden weiter und neu zu entwickeln (17, 18).

---

## **2.2 Die Infektion des Knochens und die biologischen Auswirkungen**

Osteomyelitis ist eine entzündliche Infektion des Knochenmarks, die sich im Verlauf der Zeit weiter auf den gesamten Knochen (Osteoid und Periost) ausbreitet. Diese entzündliche Erkrankung lässt sich in drei Verlaufsformen unterteilen: die akute, subakute und chronische Form. Bei der akuten Osteomyelitis ist das Periost, die Kortex und/oder der Markraum infiziert (19). Aufgrund anatomischer Prädisposition, z.B. mangelnde Phagozyten, herabgesetzter Blutfluss, mangelnder Weichteilmantel und bei Kindern eine besondere Durchblutungssituation durch die Wachstumsfugen, ist die Metaphyse der langen Röhrenknochen am häufigsten davon betroffen (20, 21). Die Ursachen einer Infektion sind vielfältig und breiten sich vor allem bei jüngeren oder immunsupprimierten Personen meist über den hämatogenen Weg aus, z.B. durch Einschwemmen von Pathogenen aus entfernten Infektionen oder bei einer trivialen Schädigung der Haut beziehungsweise (bzw.) des umliegenden Weichteilgewebes (19, 22).

Bei der post-operativen Osteomyelitis gelangt der Keim exogen auf den direkten Weg meist über die Haut in den Körper. Trotz standardisierter präoperativer Reinigung und Desinfektion, verbleibt ein Teil der Hautflora in den Follikeln und Drüsen der Haut. Weiter gelangen Pathogene entweder durch eine kontaminierte bzw. stark verunreinigte offene Fraktur (bis zu 40% der Infektionen), oder aber durch ein kontaminiertes körperfremdes Implantat in den Körper (19, 23, 24). Beim Einsatz von künstlichen Gelenken ist die Wahrscheinlichkeit einer postoperativen Infektion erhöht. Die Prothesenverankerung, die geringe Weichteilabdeckung und die lange Operationsdauer bei solchen operativen Eingriffen begünstigen eine Infektion (19, 23, 24). Seltener führen inadäquat gereinigte chirurgische Instrumente zur Kontamination des Knochens. Weiter kann eine Osteomyelitis sowohl nach einer Osteosynthese einer gedeckten Fraktur oder aber durch penetrierte Wunden entstehen.

Gelangt das Pathogen über einen der genannten Wege in die metaphysären Blutgefäße des Knochens, vermehrt es sich in den kleineren Arteriolen der Metaphyse (was zu Mikroabszessen führen kann) und bildet nach erfolgreicher Vermehrung Markraumabszesse. Im weiteren Verlauf gelangt das Pathogen über die Volkmann- und Havers-Kanäle in das Osteoid und das Periost des Knochens (20). Es kommt zu einer Infiltration von Entzündungszellen und die gebildeten Prostaglandine sind später mitverantwortlich für die Destruktion, bzw. Resorption des Knochens.

In einer postoperativen Situation werden die Entzündungs- und Infektionsprozesse durch Ödeme, Hämatome und/oder durch ein schlecht perfundiertes Gewebe beschleunigt. Anfangs bildet sich ein akutes, klinisches Geschehen mit den typischen lokalen Entzündungszeichen am betroffenen Knochen. Es zeigen sich durch Rötung, Schwellung (durch eine entzündliche Infiltration des Gewebes verursacht), Schmerzen (Periostschmerz) und Erwärmung (25, 26). Eine Verzögerung der Wundheilung über dem eingesetzten Implantat oder Ausfluss aus der Wunde sind ebenfalls aussagekräftige klinische Symptome. Befindet sich ein Gelenk in der Nähe des Infekts, kann es zu einem Gelenkserguss und einer Versteifung des Gelenkes kommen. In den Blutbefunden gilt ein Anstieg der laborchemischen Entzündungsparameter (Leukozyten und C-reaktives Protein) als auffällig. Zu der Osteomyelitis Diagnostik zählen bildgebende Verfahren wie Röntgen, Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT) oder auch die Szintigraphie (27-29). Röntgenbilder werden standardmäßig eingesetzt, doch gerade in den Anfangsstadien sind bei einer akuten oder subakuten Osteomyelitis die pathologischen Veränderungen röntgenologisch nicht oder nur schlecht darstellbar, obwohl eine Entzündung am Knochen vorliegt (27, 30-32). Experimente mit MRT Einsatz zeigten hingegen, dass frühzeitig geringgradige pathologische Veränderungen im Weichteilgewebe dargestellt und beurteilt werden können (32, 33). Die Szintigraphie kommt zweckmäßig bei einer chronischen Osteomyelitis mit stark fortgeschrittenen, pathologischen Veränderungen zum Einsatz (34).

Eine späte Diagnose geschieht oftmals bei einer guten Immunkompetenz des Patienten. Hier kommt es zunächst zu einer subakuten Verkaufsform, bei der die Infektion meist ohne klinische Symptome verläuft und erst Jahre oder sogar Jahrzehnte nach der ursprünglichen Infektion ausbricht.

Die letzte Verlaufsform ist die chronische Form der Osteomyelitis. Diese resultiert aus einer nicht diagnostizierten, subakuten Verlaufsform mit einem milden klinischen Erscheinungsbild und/oder einer behandelten Osteomyelitis mit einem persistierenden Keim (35). Die ausgebildeten Entzündungsprozesse sowie Flüssigkeitseinstrom und Abwehrzellen verursachen im Verlauf der Infektion einen ansteigenden, intraossären Druck. Es erfolgt ein Ablösen des Periostes, wodurch die kortikale Blutversorgung des Knochens vermindert wird, mit der Folge einer Knochennekrose. Das nekrotische Gewebe dient weiter als gutes Nährmedium für die Keime. Letztendlich kommt es bei der chronischen Verlaufsform zur Ausbildung von Knochensequestern (25, 26). Ausgebildete Sequester haben keine Anbindung an die Blutversorgung und können sich

---

als abgestorbene Knochenfragmente frei bewegen. Durch diesen Knochensequester kommt die Wunde nicht zur Abheilung und die fortlaufende Reizung führt zu ständigem Nässen der Wunde. Weiter ist der Prozess durch Sklerosierung, Zunahme des Knochendurchmessers sowie einer massiven Knochendestruktion (begünstigt durch eine starke Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen) mit eventueller Begleitung einer Fistelausbildung erkennbar (36).

Kommt es zu keiner Behandlung oder einer fehlerhaften Therapie kann es bei einem immungeschwächten Patienten (erneut) zu einer hämatogenen Streuung mit Bakterien in der Blutbahn kommen. In seltenen Fällen ist infolge der grossen lokalen Gewebeerstörung eine Amputation der betroffenen Gliedmaße nötig (37).

### **2.3 Osteomyelitiserreger**

Eine Osteomyelitis kann von einer Vielzahl an Keimen ausgelöst werden. Häufig sind mehrere Organismen in das Krankheitsgeschehen involviert. In 75-80% der Fälle einer Osteomyelitis ist der Hauptverursacher der Infektion *S. aureus* (38, 39). Weitere Keime sind Streptokokken, gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli*, *Pseudomonaden* und *Klebsiellen* (40). Seltener können *Aktinomyces*, *Brucella* und *Nocardia* Bakterien eine Infektion verursachen. Am seltensten, aber nicht ausgeschlossen, sind als Verursacher verschiedene Viren oder Pilze. Der Hauptverursacher einer post-operativen Osteomyelitis inklusive von Implantat-assoziierten Infektionen ist *S. aureus*, gefolgt von Mischinfektionen mit einer starken Beteiligung von *S. aureus* und einer Infektion ausgelöst durch koagulasenegative Staphylokokken (41, 42). Bei stark verunreinigten Wunden, beispielsweise bei traumatischen Frakturen, sind Erreger wie *Clostridium perfringens* und *Pseudomonaden* am stärksten beteiligt (43).

### **2.4 Conditioning Film und Bakterienadhäsion an der Implantatoberfläche**

Bei Implantat-assoziierten Operationen besteht, wie schon erwähnt, das Risiko einer Infektion - verursacht durch ein nicht steriles Implantat bzw. Eintrag von Keimen über die Hautflora (44). Eine Infektion kann aber auch durch die Reaktion des Körpers auf den implantierten Fremdkörper begünstigt werden. Nach dem Einsatz des Implantats produziert der Körper proteinogene Flüssigkeiten, die einen Oberflächenfilm bilden (45-47). Der sogenannte „conditioning Film“ (CF) umgibt das eingebrachte Implantat, wodurch sich die Oberflächenbeschaffenheit des Implantats verändern kann (Bakterielle



Adhäsion: Einfluss von CF auf die Anlagerung von Bakterien) (48) und bietet bestehenden oder eingebrachten Bakterien so die Möglichkeit, sich mittels Rezeptoren an das Implantat zu heften (49, 50). Die Adhäsion kann weiter auch von der Beschaffenheit des Implantats sowie dessen Bearbeitung (z.B.: feinporige Materialien) begünstigt werden. Die stärkste Affinität zur Adhäsion bietet Stahl. Polymethylmethacrylat und Titan hingegen weisen nur eine geringe Disposition für eine Bakterienadhäsion auf (50-53).

## **2.5 Biofilm**

Einige Bakterien haben die Fähigkeit, einen sogenannten „Biofilm“ auszubilden, der wie eine Art schützende Schleimschicht um die Bakterienkolonien organisiert ist. Ein Biofilm hat eine komplexe extrazelluläre Matrix, die unter anderem aus Enzymen besteht, welche extrazelluläre Polysaccharide ausbilden (48). In der Matrix aus Polysacchariden sind Bakterienkolonien durch Mikrokanäle miteinander verbunden. Diese Bakterien werden in dieser Biofilm-Schleimschicht vor der körpereigenen Immunantwort geschützt (48). Bei einigen der Biofilm-bildenden Bakterien, wie z.B. Koagulase-negativen Staphylokokken, wurde nachgewiesen, dass der Biofilm die Blastogenese der Lymphozyten und die Phagozytose aktiv unterbindet und die zelluläre und humorale Immunantwort somit beeinträchtigt wird. Dies begünstigt die Adhäsion von Bakterien an der Implantatoberfläche. Weiter fungiert der Biofilm aber auch als Barriere gegen Antibiotika. Er dient hierbei als eine Art „Puffer“, der durch seine Dicke eine mechanische Barriere darstellt, wodurch lokale Antibiotika Therapie nur unzureichend zum Bakterium durchdringen kann (11, 54).

Die Wahrscheinlichkeit ist gross, dass bei der Anheftung und Adhäsion eine Implantat-assoziierte Infektion erfolgt (42, 55, 56), auch bei kleiner Bakterienanzahl (57).

## **2.6 Prävention und Therapie**

Im Laufe der Jahre wurden die Operationstechniken und Operationsbedingungen verbessert und zudem eine Antibiotika Prophylaxe eingeführt, was zu einer Reduktion der postoperativen Osteomyelitis führte.

Das Hauptaugenmerk wurde auf das Erzielen eines hohen Wirkstoffspiegels direkt am Knochen gelegt. Der Einsatz von resorbierbaren Antibiotikaträgern, wie z.B. in Form von Schwämmchen oder der Einsatz von Antibiotika-imprägnierten Knochentransplantaten, die zu einem sehr hohen lokalen Wirkstoffspiegel inklusiver Auffüllung der Hohlräume

---

fürhte, verringerten die Gefahr der Ausbildung einer Osteomyelitis (58-60). Die Anwendung einer perioperativen systemischen Antibiotika Prophylaxe (61) bewirkte eine deutliche Reduktion der postoperativen Infektionen. Exogen wurden aerogene Kontaminationen durch verbesserte Filteranlagen in den Operationssälen oder aber durch den Einsatz von ultraviolettem Licht reduziert (62).

Kommt es jedoch dennoch zur Ausbildung einer postoperativen Infektion, ist häufig eine konservative Therapie, da Implantate aus der oben erwähnten Problematik der Biofilme bzw. CF eine Infektion begünstigen und zu einer Therapieresistenz führen. Sobald keine positive Antibiotika Reaktion eintritt, wird die chirurgische Kürettage unabdingbar. Das Anfertigen einer Blutkultur und die Erstellung eines Resistenztests gehören hierbei zum Standardverfahren. Wenn keine Antibiotikaresistenzen nachweisbar sind, kann vor der chirurgischen Reinigung eine Stauungsantibiose durchgeführt werden. Dabei wird das Antibiotikum unter viel Druck in das Gewebe infundiert, wodurch lokal ein hoher Wirkstoffspiegel erreicht wird. Darauf folgt eine chirurgische Kürettage, wenn sich der infizierte Knochen nicht in Gelenksnähe oder der betroffene Knochen stabil genug ist. Das infizierte Knochengewebe wird dabei abgetragen. Bei spongiösem Knochen wird empfohlen, eine Transplantation von gesundem (von der Infektion entfernten) Knochengewebe durchzuführen, um einen raschen Verschluss des entstandenen Hohlraumes zu erlangen.

Bei chronischen Infektionen mit einem Implantat muss eine Implantatentfernung, Ausschneiden der entstandenen Fistelgänge sowie das Entfernen des infizierten Weichteilgewebes und darauffolgende mechanische Spülung der infizierten Wunde oder des infizierten Gelenks (Debridement) erfolgen (35, 63, 64). Bei instabilem Knochen erfolgt eine Stabilisierung mit einem neuen Implantat. Danach folgt, wenn möglich, eine interne Stabilisierung durch beispielsweise eine Verplattung sowie eine externe Fixation des Knochens durch einen Cast. Führen die durchgeführten Therapien nicht zu einer Verbesserung oder Heilung der infizierten Wunde, ist eine Amputation der Extremität ein notwendiger Schritt, um die Entwicklung einer Sepsis oder den Tod zu verhindern (43).

## **2.7 Die Magnetfeldtherapie nach dem Kraus- Lechner- Verfahren**

Die Herausforderungen bestehen darin, neue beziehungsweise unterstützende Therapiemethoden zu erforschen, die den Knochen nach einer Infektion stärken und die Wirkung der Antibiotika unterstützen sollten, um eine effiziente Heilung einer chronischen Osteomyelitis zu bewirken.

Eine etablierte Behandlungsmethode in der Orthopädie nach chirurgischen Eingriffen ist die Anwendung der pulsierenden elektromagnetischen Feld Therapie, kurz PEMF genannt, bei der die Wechselwirkung zwischen einem niederfrequenten sinusförmigen Magnetfeld und Knochengewebe genutzt wird (65). Die PEMF Therapie bewirkt nachweislich eine Besserung der Knochenheilung vor allem bei Pseudoarthrosen, nach verzögerter Knochenbruchheilung, Schenkelhalsfrakturen und Hüftkopfnnekrosen (66-68).

Der Erfinder und Physiker W. Kraus erforschte 1968 als erster die positive therapeutische Wirkung von einem induzierten elektrischen Wechselfeld am frakturierten Knochengewebe nach dem Prinzip der „Induktion der Ruhe“. Im Jahre 1972 entwickelte er mit dem Chirurg F. Lechner ein Verfahren, das seine ersten Anwendungen in der Klinik fand (66). Bei diesem Verfahren wird in einer angewendeten Spule, durch eine Änderung der Wechselspannung der magnetische Fluss ( $\Phi$ ) im Magnetfeld verändert, wodurch eine elektrische Spannung erzeugt wird. Die Frequenz der Wechselspannung verbleibt identisch (65). Das induziert niederfrequente elektromagnetische Feld beeinflusst das Zellwachstum und es findet eine erhöhte Zelldifferenzierung statt. Es resultiert daraus eine potenzierte Kollagenbildung und gesteigerte Synthese des zellulären Gesamtproteins (69). Eine intensivierte Osteogenese am frakturierten Knochen findet statt (70, 71).

Diese Technologie nach Kraus-Lechner wird heutzutage von der Firma Magnetodyn® verfolgt und sowohl als invasive als auch nicht-invasive Komponente in der Humanmedizin zu Therapie Zwecken erfolgreich angewendet.

**Bei der invasiven intrakorporalen Komponente** wird ein implantierter Überträger (= sekundäre Feldspule), elektrisch leitend mit einer oder zwei Schrauben elektrisch verbunden. Diese werden in direkter Umgebung eines Knochendefekt platziert. Wird lediglich nur eine Schraube in den Knochendefekt gesetzt, ist die Schraube so aufgebaut, dass das Endstück als eine Elektrode, der Schaft die zweite Elektrode fungiert (bi-polare Schraube). Wenn zwei Schrauben eingesetzt werden, ist je eine komplette Schraube als Elektrode aufgebaut. Ein starkes elektromagnetisches Feld, mit einem intensiven elektrischen Feldanteil, stimuliert direkt das Knochengewebe (70, 72, 73).

**Die nicht-invasive extrakorporale Komponente** besteht aus der externen Feldspule, oder auch Coil genannt, die um das zu behandelnde/ kranke Körperteil gelegt wird. Die Feldspule wird nun an einen Frequenzstromgenerator (Magnetodyn® Generator M65 von GeoTmbH, München) angeschlossen. Vor dem Therapiebeginn werden die Parameter wie die Therapiezeit (45 bis 90 Minuten) und die jeweilige Signalform festgelegt. Die

---

Signalform der physiologischen Frequenz ist zwischen 12-20 Hertz (10-30) und die magnetische Flussdichte von 3 bis 5mT einstellbar. Die nicht-invasive Komponente überträgt ein elektrisches Potential von 700mV in die implantierten invasiven Überträgerschrauben (74).

Vorangegangene *in vitro* Versuche legen die Vermutung nahe, dass einer PEMF Anwendung auf die Kolonisation von *S. aureus* eine wachstumshemmende Wirkung haben kann. Es stellt sich die Frage, ob eine PEMF Therapie auch *in vivo* unter experimentellen Bedingungen einen heilenden Effekt auf einen derart infizierten Knochen hat (75). Die Hypothese ist, dass die Verwendung des elektrischen und magnetischen Wechselfeldes die Spannung der Biofilmmatrix der Bakterien stören könnte mit der Konsequenz, dass antimikrobielle Wirkstoffe (agents) eindringen können (75, 76).

## **2.8 Tiermodell**

Zur Erlangung von Erkenntnissen zur Wirksamkeit neuer, unerprobter Therapiemethoden stehen *in vitro* und *in vivo* Modelle zur Verfügung. Eine Untersuchung der PEMF bzgl. Ihrer Wirkung auf eine Infektion mit *S. aureus* *in vitro* vorgelagert und warf die Frage auf, ob und welche Wirkung diese auf einen solchen Infekt bei einem lebenden Organismus hat. Vor der Erprobung am Menschen gilt es, die Wirkung anhand eines geeigneten Tiermodells zu prüfen.

Dies soll im Rahmen der Studie entwickelt und erprobt werden.

### **2.8.1 Anforderungen an ein Tiermodell**

Bei der Entwicklung eines Tiermodells ist es maßgebend, die Anforderungen der jeweiligen neuen Therapieform zu beachten. Dabei gilt es die praktischen Rahmenbedingungen der Therapieform, die Vereinbarkeit mit dem Tierwohl sowie die Aussagefähigkeit der Studienergebnisse hinsichtlich späterer Anwendungen zu bedenken.

Die PEMF Therapie erfordert die Verwendung eines externen Coils, der via Kabel an einen Generator angeschlossen ist. Es ist demnach unabdingbar, dass der extern angebrachte Coil während der Therapiezeit um das zu behandelnde Körperteil angebracht werden kann (für ein Zeitintervall von zwei Mal täglich à 90 Min) und dass die Anbringung sowie die Materialien von dem jeweiligen Tier akzeptiert werden und dass das angeschlossene Kabel das jeweilige Tier nicht verletzt bzw. gefährdet.

Die Zielsetzung der Erprobung ist die spätere Anwendung in der Humanmedizin. Daher liegt es nahe, für die Osteomyelitis Pilotstudie eine Tierart zu wählen, die auch menschähnliche Knochenstrukturen bzw. für bestimmte Körperteile ähnliche Knochenlängen aufweist, um die erlangten Forschungsergebnisse später auf den menschlichen Organismus zu beziehen (77, 78).

### **2.8.2 Tiermodelle für Osteomyelitis**

Bisherige Studien zur Osteomyelitis im Tiermodell konzentrierten sich besonders auf die pathophysiologischen Prozesse einer Infektion am Knochen bzw. die Auswirkungen medikamentöser Behandlungen mit beispielsweise Antibiotika Gaben auf die jeweilige Infektion. Hierzu wurden vorwiegend Tierarten wie Kaninchen, Ratten, Mäuse, Meerschweinchen und auch Hunde als standardisiertes Tiermodell gewählt (79-85). Vor allem Hasenartige wie Kaninchen oder Nagetiere wie Ratten oder Mäuse wurden vorzugsweise dazu genutzt, um eine hohe Anzahl an Modellen gleichzeitig zu untersuchen und immunologische Abweichungen auszuschließen oder die medikamentöse Wirksamkeit zu testen (79, 85).

Den Vorteil dieser Tierarten (u. A. einfach Haltung in größerer Anzahl, damit große Fallzahlen abbildbar) stehen allerdings verschiedene Nachteile gegenüber:

Knochen von Kaninchen beispielsweise weisen nicht geschlossene Epiphysenfugen auf, vergleichbar bei Menschen im Kindesalter. Es ist experimentell möglich, Knocheninfekte am Kaninchen zu untersuchen und die Ergebnisse auf die Verteilungsmuster einer Osteomyelitis bei Kindern übertragen, nicht aber auf die eines Erwachsenen (20, 77).

Ratten wiederum verfügen über ein überaus starkes Immunsystem, was entsprechend den Einsatz einer weitaus höheren Inokulumkonzentration erforderlich machen würde, welches von der Dosierung nicht mit der für den Menschen vergleichbar wäre (83, 86).

All diesen Tierarten ist gemein, dass sie aufgrund verschiedener Anforderungen für die vorliegende Studie nicht geeignet sind.

Neben der mangelnden Vergleichbarkeit der Knochenphysiologie mit dem (erwachsenen) Menschen spielt hauptsächlich die Therapieform mittels mehrfach täglichen anzulegenden Coils eine maßgebliche Rolle. Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten würden sich aus dem externen Coil herauswinden und sowohl aus praktischem Ermessen als nicht zuletzt aus Tierschutzgründen wäre es nicht vertretbar die Versuchstiere für regelmäßige und mehrmals tägliche Anwendungen zu fixieren und so die Bewegungsfreiheit regelmäßig einzuschränken.

---

### **2.8.3 Schaf als Osteomyelitis Tiermodell**

Bei der Suche nach einer Tierart, die sowohl bezüglich der Therapieform als auch hinsichtlich verwertbarer, auf den Menschen transferierbarer Ergebnisse geeignet scheint, wurde das Schaf als am geeignetsten befunden.

Zunächst lassen die Haltungsansprüche des Schafes mit angemessenem Aufwand eine gute artgerechte Haltung zu. Es kann trainiert werden, lässt nach Eingewöhnung auch das Anlegen von Materialien am Körper zu und ist problemlos zu behandeln. Für röntgenologische Aufnahmen oder zur Nachbehandlung ist eine Sedierung nicht notwendig. Das Schaf kann stressfrei (wie z. B. bei der Wollschur) aufs Gesäß umgesetzt werden, ohne ein Verletzungsrisiko für das Tier oder das Personal zu riskieren. Nicht zuletzt ist das Tier ausreichend groß, um die benötigten Materialien und Coils problemlos anzulegen. Zu beachten gilt, dass das Schaf sich nach dem Weidegang im Versuchsstall ausreichend akklimatisieren kann, d. h., dass dem Schaf genug Zeit gegeben wird, sich an den Versuchsstall und die Menschen zu gewöhnen.

Des Weiteren besitzt das Schaf ein robustes Immunsystem. Dies lässt vermuten, dass bei einem lokal gesetzten Inokulum auch bei einer höheren Keimkonzentration das Immunsystem eine Osteomyelitis lokal eingrenzt und die Gefahr der Ausbreitung auf das umliegende Gewebe oder sogar einer Sepsis gering ist.

Allen voran weist das Schaf ein Knochenstruktur auf, die der des adulten Menschen in den Punkten Knochenmakro- sowie Mikrostruktur sehr ähnlich ist (77, 78, 87).

Dies betrifft neben der Knochendichte und -struktur auch im Besonderen die Knochenlängen und Proportionen der Vorder- und Hintergliedmaßen sowie die Knochenheilung (44, 77, 78, 87).

Zwar ist aufgrund seiner Haltungsansprüche und schlichter Größe eine vergleichbar hohe Individualzahl wie bei vorgenannten Tierarten nicht im überschaubaren Rahmen umsetzbar, allerdings lassen Wesen und Physiologie des Schafes eine gute Durchführbarkeit und Ergebnisqualität erwarten (88, 89).

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Aufbau der Studie**

Der Aufbau der Studie wurde auf Basis der Erkenntnisse aus der ersten Pilotphase angepasst und wich deshalb vom ursprünglich geplanten Ablauf ab. Daher wird im folgenden Text zuerst der geplante Studienaufbau beschrieben, gefolgt von der Beschreibung des tatsächlich durchgeführten Studienverlaufs.

Der Versuchsaufbau des Experiments wurde anfangs in eine Pilotphase und eine Hauptphase unterteilt.

##### **3.1.1 Geplante Pilotphase**

Ziel dieser Phase war es, ein geeignetes Tiermodell zu etablieren und dabei sowohl die Operationsmethode und -technik als auch die geeignete Konzentration des eingesetzten Bakterien-Inokulums ( $2 \times 10^5$  KbE) im Schafmodell ( $n=4$ ) zu evaluieren. Dazu wurde das *S. aureus* enthaltende Inokulum erstens in das Schraubenloch einer distal am medialen Femurkondylus implantierten Schraube und zweitens unter einen chirurgisch abgelösten und wieder eingesetzten Knochenblock medial an der proximalen Tibia eingebracht werden. Ziel war zu untersuchen, ob sich ein bakterieller Infekt periimplantär und im Knochen etabliert oder ob das Schaf-Immunsystem die Bakterien im Zeitraum von zwei ( $n=2$ ) und vier Wochen ( $n=2$ ) spontan eliminieren kann. Resultate sollten mittels Bakterienkulturen und Gewebe/Knochenhistologien analysiert werden.

##### **3.1.2 Geplante Hauptphase**

Das in der Pilotphase etablierte und geprüfte Tiermodell für die Entwicklung einer lokalen Knochenentzündung sollte nun genutzt werden, um die Wirkung des Magnetfeldes innerhalb des Magnetodyn®-Verfahrens auf den Verlauf der Knocheninfektion zu testen. Ziel dieses Experimentes war der Nachweis einer positiven Wirkung auf die Heilung und die Eindämmung der Infektion durch *S. aureus* zu beweisen. Es sollte dabei eine Behandlungsgruppe mit PEMF ( $n=6$  Schafe) mit einer Kontrollgruppe ohne PEMF ( $n=6$ ) verglichen werden.

### 3.1.3 Umgesetzte Studie

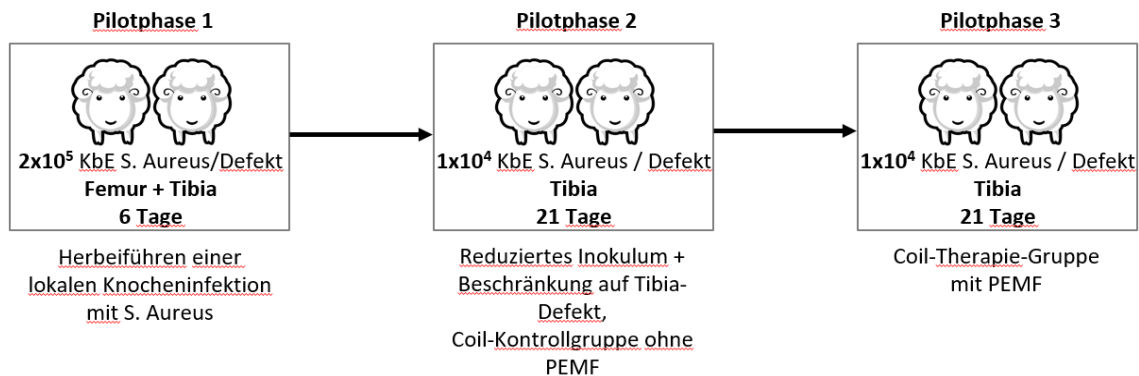


Abbildung 3.1: realisierter Studienverlauf in 3 Pilotphasen

Aufgrund der Erkenntnisse aus der Pilotphase 1 (in Bezug auf das Tierwohl und die damit einhergehende schlechte gesundheitliche Verfassung post OP) wurden Studienaufbau, Operationsmethodik sowie Inokula-Konzentration und -Volumen angepasst (siehe Abb. 3.1 und Tab. 3.1). Folglich wurde die durchgeführte Studie in drei Phasen unterteilt. In der Pilotphase-1 wurde die Bakterienanzahl getestet und bestimmt, um eine lokale subklinische Infektion am Oberschenkel- und Unterschenkelknochen zu provozieren. Darauf folgte die Pilotphase-2, in der die eingesetzte Bakterienanzahl reduziert und zusätzlich den Tieren die externe Feldspule (Coil) zweimal täglich angehängt wurde (Kontrollgruppe). In Pilotphase-3 mit gleichbleibender Inokulum-Konzentration erhielten die Versuchstiere zusätzlich zum Anbringen der externen Feldspule, die elektrische Impulsstimulation als Therapie (Therapie-/Behandlungsgruppe).

Tier	Gruppe	Experiment	Marvel Überträger implantiert	Marvel Coil verwendet	PEMF Therapie	geplantes Inokulum Femur KbE	geplantes Inokulum Tibia KbE
101.01	Pilotphase 1	Kontroll-Implantat	ja	nein	nein	2.00E+05	2.00E+05
101.02							
101.03							
101.04	Pilotphase 2	Kontroll-Implantat	ja	ja	nein	-	2.00E+04
101.05	Pilotphase 3	Test-Implantat	ja	ja	ja	-	2.00E+04
101.06							

Tabelle 3.1: Übersicht Versuchstiere in den Pilotphasen

Nach jedem Abschluss einer Pilotphase wurden die gewonnen Resultate und Erkenntnisse validiert und als Konsequenz die darauffolgende Phase angepasst und optimiert.

## 3.2 Bakterien

Die *S. aureus* Inokula der vorliegenden Studie, wurden im Universitätsspital Zürich von PD Dr. med. Yvonne Achermann und Tiziano Schweizer aufbereitet. Verwendet wurde der Laborstamm *S. aureus* ATCC 25923 – auch Seattle 1945 Stamm genannt (44, 90).



Diese Bakterienkultur wurde als BSL-2 Organismus klassifiziert. Die Arbeitsabläufe zur Herstellung der Inokula liefen wie folgt ab (siehe Abb. 3.2):

Die S.-Stammkultur wurde bei -80 Grad in einer Tryptic-Soja-Bouillon Lösung (TSB, Becton-Dickinson) mit 40% Glyceringehalt konserviert gelagert. Zur Aufbereitung wurde aus dem Glycerinstock mit einer Impföse ein Abstrich der Stammkultur entnommen und ein Verdünnungsausstrich auf eine Columbia Blut Agar Platte (Columbia Agar + 5% Schafblut, bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland) ausgestrichen. Die Agar Platte wurde für 24 Stunden bei 37 Grad inkubiert. Zwölf Stunden vor Einsatz des Inokulums wurde eine einzelne Kolonie von der Agarplatte geerntet und mit Hilfe einer Impföse in ein 50 ml Falcon Tube mit 8 ml Hirn-Herz-Glucose-Bouillon (BHI, Becton-Dickinson) Flüssigmedium gemischt. Dieses wurde in einem Inkubator mit 220 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei 37 Grad inkubiert. 0,08 ml der Kultur (entspricht dem Verhältnis 1: 100) wurde nach 12 Stunden mit Hilfe einer Pipette entnommen und in ein 50 ml Falcon Tube mit einem darin enthaltenen 8 ml BHI Flüssigmedium pipettiert. Um die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase ernten zu können, wurde das Falcon Tube für weitere zwei Stunden bei 37 Grad Bebrütungstemperatur und einer Drehzahl von 220 rpm inkubiert. Um die Zellen vom Medium zu reinigen, wurden die Bakterien im Falcon Tube danach für 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde mit einer Pipette entfernt. Die auf den Boden abgesetzten Bakterien wurden dann in 1 ml phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, Kantonapotheke Zürich) resuspendiert. Danach wurde eine optische Dichtemessung (OD) nach Rosenbach durchgeführt (die eine Quantität für Bakterienmasse darstellt). Ziel war es, den vorher festgelegten OD Wert von 0,4 zu erreichen, was einer Anzahl von  $4 \times 10^7$  koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KbE/ml) entsprach. Dazu wurde von der resuspendierten, exponentiellen Bakterienkultur 30 µl in ein neues mit 1 ml PBS befüllte Tube pipettiert und anschließend der OD Wert mit einem Dichtemeter überprüft. Die erlaubte Abweichung vom OD Wert 0,4 betrug  $\pm 0,02$ . Sollte der Wert zu weit davon abgewichen sein, wurde entweder mehr PBS oder mehr Bakterienlösung hinzugefügt, bis der Wert 0,4 betrug. Danach wurde die Lösung so verdünnt, dass die gewünschte Inokulumkonzentration erreicht wurde.

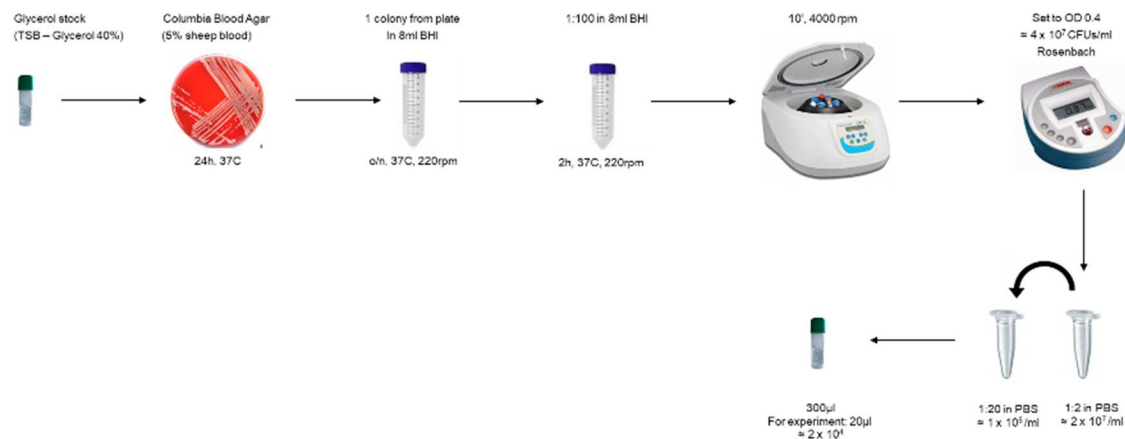


Abbildung 3.2: Herstellungsprozess des Inokulums; Quelle Universitätsspital Zürich

Für die Pilotphase-1 wurden pro Versuchstier je ein Inokulum für den Tibiadefekt und eines für das Schraubenloch im Femur mit einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  KbE in 100 µl Lösung verwendet. Für die Pilotphase 2 und 3 wurde das Inokulum mit einer Konzentration von  $1 \times 10^4$  KbE in 20 µl Lösung pro Versuchstier pro Versuchstier in den Tibiadefekt injiziert. Diese Werte gaben die berechnete Menge *S. aureus* Bakterien der Inokula wieder.

Zur Kontrolle der Konzentration wurde nach Einsatz der Inokula im Universitätsspital Zürich die tatsächliche Bakterienanzahl bestimmt. Dazu wurden die Inokula 10-fach serienmäßig verdünnt und auf einer Agar Platte ausplattiert, um die genaue Anzahl KbE pro Inokulum zu bestimmen.

### 3.3 Biosafety

Aufgrund des verwendeten Bakterien-Stammes war die Unterbringung der Versuchstiere in Übereinstimmung mit den Biosicherheitslevel 2 Vorschriften (spezifisch skizziert in Ordinance 814.912 Annex 4 (Artikel 12) erforderlich. Hierfür wurden in Abstimmung mit dem Bundesamt für Gesundheit (BAG) spezielle Biosafety-Level-2-Ställe errichtet, in der während der gesamten Versuchsdauer keine weiteren Tiere untergebracht waren. Zudem wurden besondere Maßnahmen in Abstimmung mit dem BAG nach standardisierten Prozeduren erarbeitet und in der MSRU und an der Universität Zürich ausgeführt. Diese Maßnahmen betrafen die Sauberkeit des Stalls, die erforderlichen Installationen im Operationssaal, den Ställen, der Schlachthalle und in der Pathologie sowie die angemessene Sicherheitskleidung für das Personal. Materialien, die Kontakt mit den Versuchstieren während der Operation, in der Versuchszeit sowie bei der

Schlachtung hatten, wurden gesichert entsorgt. Das Personal wurde aus einem Blickwinkel der Biosicherheit gesondert geschult.

Während der Operationen und auch bei der Entnahme der gewonnenen Proben wurde steril gearbeitet, nach jedem Kontakt mit dem Inokulum oder infiziertem Gewebe die sterilen Handschuhe gewechselt und jegliche Materialien nach BSL-2 Standard angemessen entsorgt.

### **3.4 Tiere**

Für das Experiment wurden sechs weibliche weiße Alpenschafe mit einem durchschnittlichen Alter von 2,8 Jahren (2-3 Jahre) und einem durchschnittlichen Körpergewicht von 74.9 kg (61.2-85 kg) ausgewählt. Bei der Ankaufsuntersuchung wurden alle Schafe auf die allgemeine sowie Klauen- und Eutergesundheit untersucht und eine Blutprobe an der Vena Jugularis entnommen (Vacutainer-System, Belliver Industrial Estate, Plymouth, U.K.), um das Blut serologisch auf Maedia-Visna-Antikörper zu untersuchen. Des Weiteren wurden die Tiere gegen Pasteurellen und Clostridien geimpft (Ovilis Heptavac P ad us. vet. 2ml /Tier s.c., Veterinaria AG Zürich, Schweiz), und bestandseigene Ohrmarken eingezogen. Zur Behandlung bzw. Prävention von Endo- und Ektoparasiten wurden die Tiere mit Endex® (1 ml/ 5kg p. o., 8,75 % ad us. vet., orale Suspension) und Dectomax® (1 ml/50 kg KGW, entspricht 0,2 mg/kg KGW, s.c., Pfizer AG, Zürich, Schweiz) behandelt.

Die Schafe verweilten bis Projektbeginn ganzjährig auf dem Staffeleggghof in Küttigen, AR, Schweiz, wo sie täglich beobachtet und in einem sechswöchigen Intervall von Tierärzten auf die allgemeine Gesundheit untersucht sowie einer Klauenpflege unterzogen wurden.

### **3.5 Vorbereitung**

Vor Studienbeginn wurden die Schafe von Staffelegg zum Tierspital transportiert und für je sieben Tage akklimatisiert. Die Tiere hatten in dieser Zeit und während der gesamten Versuchszeit Zugang zu Wasser, Futterheu und Minerallecksteine ad libitum. Alle Schafe, die für die Studie in Frage kamen, wurden klinisch allgemein untersucht, gewogen und es wurde jedem Tier eine Blutprobe (EDTA, Serum) entnommen, um den Hämatokrit und die Blutchemie zu überprüfen. Es wurden nur gesunde Schafe mit Werten im Normbereich für die Studie ausgewählt.

---

## 3.6 Operation

### 3.6.1 Operationsvorbereitung

Nach der siebentägigen Eingewöhnungsphase wurden die Schafe einen Tag vor der geplanten Operation zum Tierspital Zürich transportiert und dort für 24 Stunden gefastet. Wasser stand ihnen ad libitum zur Verfügung. Zusätzlich wurde das Operationsfeld (linkes/rechtes Hinterbein) großflächig geschoren.

### 3.6.2 Anästhesie

Am Tag der Operation wurde zunächst eine klinische Untersuchung des Schafes durchgeführt, inklusive Herz- und Lungenauskultation. 30 Minuten vor Anästhesieeinleitung erfolgte die Prämedikation mit Medetomidin (0,01 mg/kg KGW i. m., Domitor Orion Animal Health, Turku, Finland) und eine Analgesie mit Buprenorphin (Temgesic®, 0,1 mg/kg KGW i. m., Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz). Unter sterilen Bedingungen wurde ein Venenverweilkatheter (14 GH, 3.25 IN, 2.1x83 mm, Angiocath Provet AG, Lyssach, Schweiz) in die Vena Jugularis gelegt. Zur analgetischen und antiphlogistischen Versorgung wurde Carprofen (Rimadyl®, 4 mg/kg KGW, Zoetis Schweiz GmbH, Delémont, Schweiz) intravenös appliziert. Als Prophylaxe wurde zusätzlich Tetanus Serum subkutan injiziert (Tetanus-Serum Intervet ad us. Vet., 3000 I.U./Tier, MSTD Animal Health GmbH, Luzern, Schweiz). Die Anästhesieeinleitung erfolgte mit Ketamin (Ketanarkon® 100 ad us. vet., 3 mg/kg KGW, Streuli Pharma AG, Uznach, Schweiz) und Midazolam (Midazolam Sintetica, 0,1 mg/kg KGW i. v., Syntetica AG, Mendrisio, Schweiz). Zusätzlich wurde Propofol (Propofol 1% MCT Fresenius, 0,4-0,6 mg/kg KGW i. v., Fresenius Kabi AG, Oberdorf, Zürich) verabreicht. Es folgte eine endotracheale Intubation und die Lagerung auf dem Operationstisch. Es erfolgte eine balancierte Anästhesie mit Hilfe einer Isofluran-Sauerstoff-Inhalation (Attane™, Isoflurane ad us. Vet., 1-1,5%, Provet AG, Lyssach, Schweiz) und konstanter Infusionsrate mittels Spritzenpumpen von Propofol (1 mg/kg/h) und Ketamin (1,2 mg/kg/h). Der Flüssigkeitshaushalt wurde intraoperativ mit einer Ringer- Lactat- Lösung (5 ml/kg/h, Fresenius Kabi AG, Oberdorf, Schweiz) stabil gehalten. Während der gesamten Operationszeit wurde ein Anästhesie Monitoring durchgeführt und die Parameter alle Zehn-Minuten protokolliert. Das Monitoring beinhaltete Elektrokardiographie, Kapnographie, Pulsoxymetrie, Blutgasanalyse, nicht-invasive oder invasive Blutdruckmessung sowie eine Temperaturmessung.

### 3.6.3 Chirurgicaler Eingriff

Die Schafe der Pilotphase-1 wurden am Femur und an der Tibia operiert. Zur schonenden und exakten Lagerung wurde das Schaf nach der Anästhesieeinleitung auf einer Vakuummatte in Seitenlage positioniert (siehe Abb. 3.3). Der chirurgische Eingriff erfolgte bei Schaf 101.01 an der linken und bei Schaf 101.02 an der rechten Hinterextremität. Die nicht zu operierende Hintergliedmaße wurde kaudo-dorsal ausgezogen und in Extension an den OP-Tisch fixiert (siehe Abb. 3.3). Nach dem Scheren wurde die OP-Gliedmaße zur aseptischen Reinigung in Suspension hochgebunden. Es folgte eine dreifache, großflächige, präoperative Hautdesinfektion des Operationsfeldes mit Hibiscrub®-Seife, 70% Ethanol (Alcohol isopropylicus 70% von Hänseler, Swiss pharma, Herisau, Schweiz) und Octenisept (Octeniderm farblos, von Schülke&Mayr GmbH Norderstedt, Deutschland). Danach wurde die zu operierende Hinterextremität in OP-Position gebracht (siehe Abb. 3.3) und mit Operationstüchern abgedeckt. Die Fixierungen gewährleisteten das die Hintergliedmaße während des chirurgischen

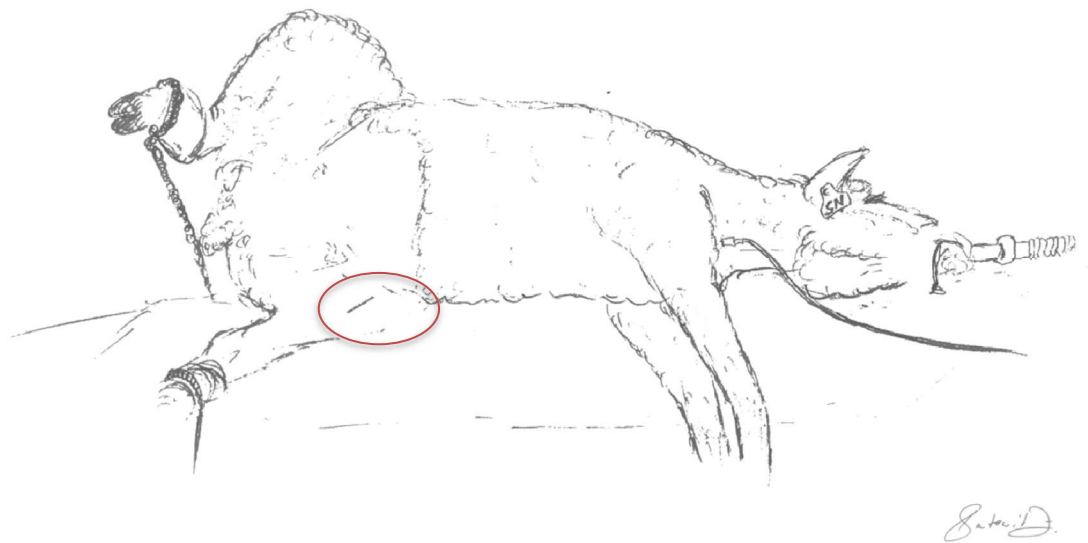


Abbildung 3.3: Lagerung Schaf in Pilotphase1-bis 3; ROI (rot); Illustration von Dr. med. vet. Serah Saitowitz

Eingriffes in Position verblieben.

Der operative Zugang erfolgte an der proximalen Tibia und am distalen Femur von medial. Nach einem Hautschnitt (Skalpell 22“, Swann, Morton, Sheffield, England) über dem medialen Femurkondylus wurden darunterliegende Unterhaut und Faszien mittels Elektrokauter durchgetrennt und der mediale Femurkondylus frei präpariert. Ein Bohrlochdefekt wurde in den distalen Femurkondylus gesetzt. Für diesen Defekt wurde

---

ein speziell entwickelte Bohrlehre und Bohrer mit Stoppring (DePuy Synthes Technologie, Ø2,5 mm) mit einer Länge von 18 mm benutzt, der eine exakt standardisierte Defekttiefe gewährleistete. Ein weiterer Hautschnitt wurde von medial über der proximalen Tibia gesetzt, die tieferen Schichten mittels Elektrokauter durchtrennt und die proximale Tibiametaphyse freigelegt.

Eine maßgearbeitete Schablone (Schnittlehre, Material: Implantatetestahl 316L, Größe: L 34 x B 20.2 x H 19 mm, DePuy Synthes, Zuchwil SO, Schweiz) (siehe Abb. 3.5) mit einem Innenmaß von 1x1 cm wurde auf Höhe der Tibiametaphyse gelegt und somit die Defektlokalisation festgelegt. Um eine ausreichende Distanz zum Defekt zu gewährleisten, wurde mit zwei gelben sterilen Kanülen (20G single use needle, Henke-Sass Wolf, Tuttlingen, Deutschland) der Gelenksraum markiert. Dann wurden mittels Elektrokauter die Ränder des Defektes markiert und diese weiter von Weichteilgewebe befreit.



Abbildung 3.4: OP-Set der Pilotphasen-2 und-3



Abbildung 3.5: Tibia-Schablone mit dem Innenmaß von 1x1 cm

Nach Entfernung der Schablone wurde ein quaderförmiger Knochenblock mit einer Kantenlänge zwischen 0,7- 0,9 cm bei einer Höhe von ca. 0,5 cm mittels einer Piezoelektrischen Säge (siehe Abb. 3.4) unter steriler Wasserkühlung (0,9% Kochsalzlösung, 10 ml/min) und Hilfe eines Knochenmeißels entnommen. Der Knochenblock wurde gemessen und auf eine sterile Ablage gelegt. Je 100 µl Inokulum mit dem Bakterium *S. aureus* ATC 25923 mit einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  KBE wurden mit einer Mikropipette aufgezogen und jeweils in die zwei Defektlokalisationen injiziert. Der Operateur wechselte danach die sterilen Handschuhe, um bei weiteren Operationsschritten eine Kontamination des restlichen Operationsfeldes zu vermeiden.

Nach Einsatz der Inokula wurde der metaphysäre Tibiadeфекt mit dem Knochenblock verschlossen und mit einer Stahlplatte (siehe Abb. 3.4; Größe: L 28.4 x B 12 x H 4 mm, Isolationseinsatz Ø 8.4 mm, Material: Implantatetestahl 316L, Isolationseinsatz PEE,

DePuy Synthes, Zuchwil SO, Schweiz) und zwei Kortikalisschrauben (Größe: 3.5 mm Kortikalisschraube selbstschneidend, L 12 mm, Material: Implantatstahl 316L, DePuy Synthes, Schweiz) fixiert. Durch zwei Clips wurden die Kortikalisschrauben mit einem SI-ES 10cm Überträger (Sekundär Induktivität Ein-Seitig, 10cm Anschlusslänge, 2,5 mm Inbus) verbunden. Der Tibia-Überträger wurde anhand eines Multimeters auf seine Funktion geprüft. Hatte der gemessene Wert einen Widerstand von  $90\pm 15$  Ohm, galt der Tibia Überträger als funktionstüchtig und der Wert wurde protokolliert. Anschließend wurde der Überträger kranio-lateral der Tibia zwischen Knochen und M. tibialis cranialis platziert. Am Femurdefekt wurde nach dem Injizieren des Inokulums in das Schraubenloch eine BISS-Schraube (Bipolares Induktions-Schrauben-System, 3,5 mm Hexagon, Größe: Ø 4.5 mm, selbstschneidend, L 18 mm; Material: Implantatstahl 316L, Synthes, Schweiz) eingesetzt. Diese wurde dann anhand eines Clips mit einem SI-ES 10cm Überträger verbunden und der Überträger wurde kaudal der Tibia zwischen Knochen und Muskelgewebe positioniert. Alle Schrauben und Überträger dienten als Teile der invasiven Komponente der Magnetfeldtherapie. Die einzelnen Gewebeschichten wurden über den Implantaten mit resorbierbaren chirurgischen Nahtmaterial (2-0 PDS™ II von Ethicon) verschlossen. Die Haut wurde intrakutan mit resorbierbaren monofilen Nahtmaterial (Biosyn 3-0, Medtronic Covidien-TM, Zürich, Schweiz) vorlaufend vernäht und zusätzlich mit einem Hautkleber (Surgical Skin Glue Maxima by Henry Schein, Melville, NY, 11747, USA) verklebt. Die Wunde wurde anschliessend mit selbstklebendem Ioban (3M Ioban™ 2 von 3M Health Care, Mexico) abgedeckt.

Postoperativ wurden zwei Röntgenbilder des operierten Hinterbeines in medio-lateralen und kaudo-kranialen Strahlengängen angefertigt. Die bestandsspezifische Ohrmarke wurde entfernt, eine Ohrmarke mit der projektbezogenen Nummer eingezogen und die Klauen geschnitten. Nach der Operation und Extubation erhielten die Tiere zur Aufhebung der sedativen Wirkung von Medetomidin Atipamezol (Antisedan, i. m., 0,01-0,03 mg/kg KGW, ad us vet., Orion Animal Health, Turku, Finnland,) injiziert und wurden daraufhin in den BSL-2 Stall transportiert.

Während der Operation (OP) aller Pilottiere wurden Biosafety-Maßnahmen durchgeführt. Diese beinhalteten eine angemessene Schutzkleidung aller Personen, die einen Kontakt zu den operierten Schafen hatten. Das OP-Besteck, das mit dem Tier während oder nach dem Inokulum-Einsatz benutzt wurde, wurde nach Benutzung in ein 70% Ethanol Bad (Alcohol isopropylicus 70% von Hänseler, Swiss pharma, Herisau, Schweiz) gelegt und

---

danach standardmäßig gewaschen und sterilisiert. Einmal-OP-Material und auch die Schutzkleidung wurden in einem Biosafety Container entsorgt.

In der Pilotphase-2 und -3 wurden während des chirurgischen Ablaufes folgende Änderung vorgenommen:

- Es wurde ausschließlich an der linken Hintergliedmaße operiert
- Es wurde lediglich ein Defekt an der Tibia durchgeführt
- Das Gelenk wurde nicht mehr mit sterilen Kanülen markiert
- Die Inokulumkonzentration wurde auf  $1 \times 10^4$  KbE und auf ein Volumen von 20  $\mu$ l herabgesetzt.

### **3.7 Magnetfeldtherapie der Kontroll- und Behandlungsgruppe**

Im vorliegenden Experiment wurde ein niederfrequentes sinusförmiges Magnetfeld verwendet. Die Spulen von denen das Magnetfeld ausging, setzten sich aus zwei Komponenten zusammen: einer invasiven sekundären Spule im Körper und einer nicht-invasiven Feldspule, die von aussen am Bein angebracht wurde. Beim Anbringen der nicht-invasiven Spule wurde darauf geachtet, dass diese sich in der unmittelbaren Nähe zur invasiven Spule befand.

Die externen Feldspulen wurden mit Hilfe eines Gürtels am Bein befestigt, der wie ein Geschirr je um Brust- und Bauchumfang geschnallt wurde. Das operierte Hinterbein des Schafes wurde in die Feldspule geführt und diese mit drei Schnallen (zwei lateral, eine medial) an dem Bauchgurt fixiert. Dies gewährleistete, dass sich das Schaf ohne weitere Einschränkung bewegen konnte.

Die Behandlungsdauer betrug zweimal 90 Minuten (morgens und nachmittags) mit einem Abstand von ca. 5:58 Stunden (Mittelwert) zwischen den beiden Behandlungen. Die Generatoren waren werkseitig auf eine Therapiezeit von 45 Minuten und 20 Herz (Hz) vorprogrammiert. Um die gesamte Therapiezeit von 90 Minuten einzuhalten, wurde nach dem ersten Durchlauf eine weitere Therapiezeit eingestellt.

#### **3.7.1 Invasive Komponente**

Die invasive Komponente bestand aus Sekundärspulen, die in den Körper implantiert wurden (siehe Abb. 3.6). Diese Sekundärspule, ein individuelles Überträgersystem, auch SI-ES (Sekundär Induktivität Ein-Seitiger) genannt, bestand aus einem Überträger und einem Kabel. In der Pilotphase-01 wurde für den Femur ein SI-ES 20cm (20 cm Kabel-Anschlusslänge mit 3.5 mm Inbusgröße) und in allen Pilotphasen für die Tibia zwei SI-



ES10cm (10 cm Kabel-Anschlusslänge, 2,5 mm Inbusgröße) angewendet; der Überträger war eine universale biokompatible Überträgerstange (ca. 3 cm lang, 0,5 cm Durchmesser) mit einseitigen Ausgängen. Ihre Enden waren mit Kortikalisschrauben verbunden, die durch Bohrlöcher in den zu behandelnden Knochen geschraubt wurden. Als Schrauben wurden in der vorliegenden Studie zwei Kortikalisschrauben in die Tibia eingesetzt. Beide Schrauben stellten dabei jeweils eine Elektrode dar, zwischen denen ein elektrisches Potential aufgebaut wurde. Die im Femur verwendete Schraube (BISS-Schraube = Bipolares-Induktions-Schrauben-System) hatte eine kugelförmige, isolierte abgegrenzte Schraubenspitze, bei der der Schaft und das Endstück die Elektrode 1 und 2 bildeten.

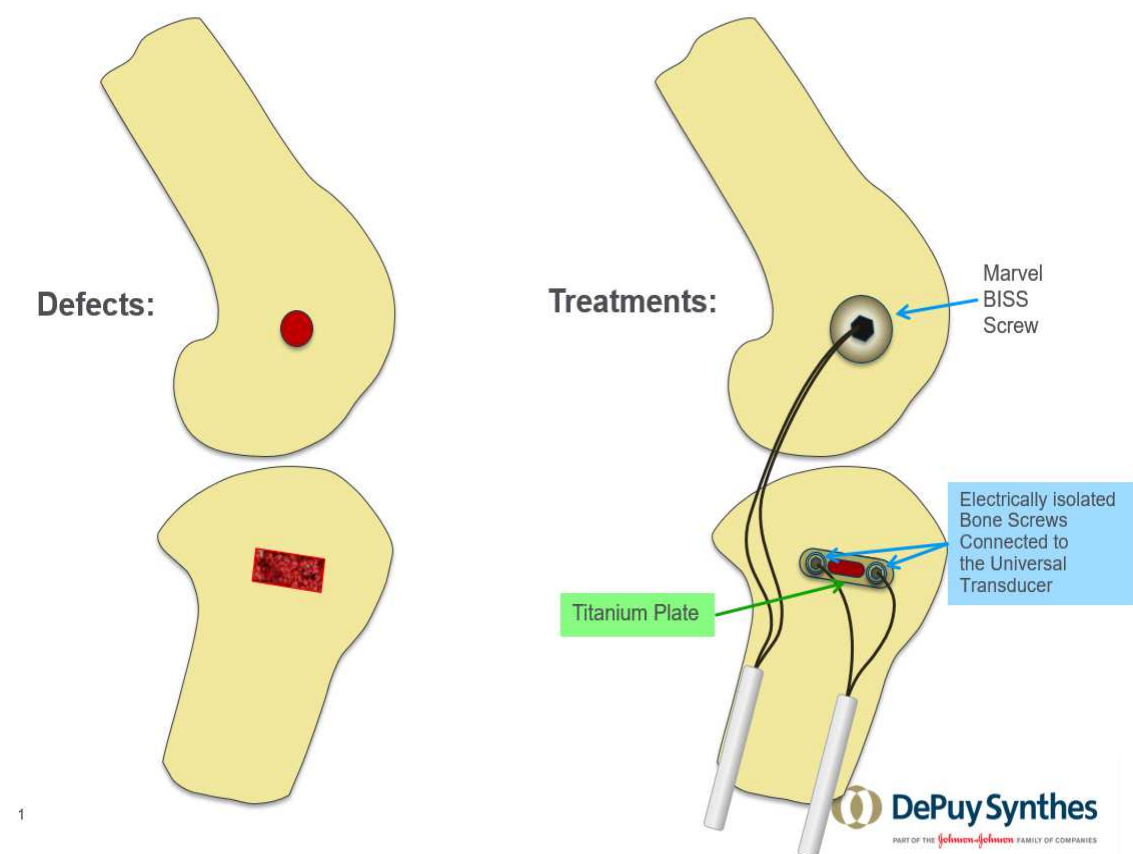


Abbildung 3.6: Knochendefekt (Femur + Tibia) und eingesetzte invasive Komponenten (Schrauben, Überträger und Platten); Marvel: Projektname bei DePuy Synthes; Illustration von Beat Lechmann

### 3.7.2 Nicht-invasive Komponente

Die nicht-invasive Komponente erzeugte ein elektromagnetisches Wechselfeld und verursachte in der invasiven Komponente (den Überträgern) eine Wechselspannung.

Dieses magnetische Feld, transportiert ein elektrisches Potential von maximal 700mV in den implantierten Überträger.

---

Bei den Tieren aus der Pilotphase-1 kam die nicht-invasive Komponente nicht zum Einsatz. Bei den Versuchstieren der Pilotphase-2 (Kontrollgruppe) wurde mithilfe eines Bauchgurtes (siehe Abb. 3.7) ab dem ersten Tag nach der Operation bis zum Ende des Versuches zweimal täglich für die Dauer von je 90 Minuten eine externe Feldspule (Coil) um das operierte Bein gehängt. Es wurde jedoch keine Magnetfeldtherapie durchgeführt.



*Abbildung 3.7: Bauchgurt (blau) mit Coil (rot) am Schaf*

Die zwei Schafe der Pilotphase-3 (Behandlungsgruppe) erhielten zweimal täglich für je 90 Minuten die Magnetfeldtherapie durch die externe Feldspule. Um die Wunde sauber zu halten und während des Tragens der Spule möglichst wenig Druck auf die Wunde auszuüben, wurde der Coil mit einem passgenauen Polyschaumstoff (Polyschaum RG 4050, 20 mm von Planenlager, Königsbrunn, Deutschland) ausgekleidet (Siehe Abbildung 3.7). Vor jeder Anwendung wurde ein neuer Schaumstoff in den Coil gelegt und mit schwarzen Klebeband in der Innenseite des Coils fixiert. Nach jeder Therapie wurde der Schaumstoff entfernt und der Coil mit 70% Alkohol desinfiziert.

## **3.8 Therapiebegleitende Maßnahmen**

### **3.8.1 Klinische Untersuchung**

Während der gesamten Zeit des Experiments wurden alle Tiere intensiv betreut. Zweimal täglich wurden eine allgemeine klinische Untersuchung und die Evaluierung der

Operationswunde durchgeführt und anhand zweier separater Bewertungsbögen dokumentiert. Mit dem Bewertungsbogen zur allgemeinen Untersuchung (Anhang Tabelle 8.1) wurden die Beobachtungen zum allgemeinen Verhalten, der Körperhaltung, das Vorhandensein und/ oder Anzeichen einer Lahmheit und der Appetit festgehalten sowie die Überprüfung der Atmung und eventuelle Anzeichen von Schmerz aufgezeichnet. Um Anzeichen einer Sepsis festzustellen, wurde zweimal täglich die Körpertemperatur gemessen und dokumentiert (Untertemperatur, Normaltemperatur oder Fieber).

Zusätzlich wurde mit Hilfe eines Osteomyelitis-Bewertungsbogens (Anhang Tabelle 8.2 und Tabelle 8.3) das operierte Hinterbein evaluiert. Bewertet wurden Vorhandensein bzw. Schweregrad einer Schwellung des operierten Bereiches, eventueller Flüssigkeitsaustritt aus der Wunde, Sensitivität bei Palpation des operierten Beines sowie Wärme und Röte der Wunde. Weiter wurde noch die OP-Naht beurteilt. Die Bewertung erfolgte anhand einer Skala von 1-5 und eines ergänzenden Kommentars mit zusätzlichen Beobachtungen und Auffälligkeiten. Dieses Scoring-Sheet bildete die Grundlage für Entscheidungen während des Versuchsverlaufes.

Es wurden folgende **Kriterien für das Punktesystem** festgelegt (siehe Anhang Tab. 8.3):

**35 Punkte (Bestwert):**

Maximum der zu erreichenden Punkte

**< 26 Punkte:**

Schmerztherapie wird eingeleitet

**< 15 Punkte:**

weitere klinische Untersuchungen werden durchgeführt unter der Leitung eines erfahrenen Veterinärmediziners. Der Zustand des Tieres muss sich spätestens innerhalb von 36 Stunden nach eingeleiteter Therapie verbessern, ansonsten folgt die vorzeitige Euthanasie und der Abbruch des Experimentes

**< 10 Punkte:**

vorzeitige Euthanasie und der Abbruch des Experimentes

### **3.8.2 Postoperative Schmerzmedikation**

Die Schafe erhielten am Tag der Operation alle 4-6 Stunden Buprenorphin Injektionen (Temgesic® 0,01 mg/kg KGW i. m., Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz). Eine

---

Schmerztherapie mit Buprenorphin (0,01-0,03 mg/kg KGW i. m.) wurde fortgeführt, wenn die Schafe Schmerzäußerungen und starke Anzeichen von Lahmheit zeigten. Die Buprenorphin-Gabe erfolgte nur nach einer klinischen Untersuchung und wurde individuell nach Bedarf verabreicht. Die Dosierung erfolgte nach Schweregrad der Lahmheit und/oder der Schmerzäußerungen als einfach- doppelt- oder dreifach- Dosis. Als Teil der analgetischen Therapie wurde Carprofen (4mg/kg KGW s.c., Rimadyl®, Zoetis Schweiz GmbH, Delémont, Schweiz) einmal täglich während der gesamten Versuchszeit in der Pilotphase-1 injiziert. In der Pilotphase-2 wurde Carprofen für 10 Tage und in der Pilotphase-3 für 15 Tage verabreicht. Nach der oben genannten Zeit, wurde den Schafen der letzten beiden Pilotphasen die halbe Dosis Carprofen (2mg/kg KGW, Rimadyl®) einmal täglich bis Versuchsende verabreicht. In der Pilotphase-1 wurde in den ersten 1-3 Tagen noch das Schmerzmittel Paracetamol (10mg/kg KGW, Paracetamol Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) zur Schmerztherapie hinzugefügt.

### **3.8.3 Blutuntersuchung**

Postoperativ wurde den Schafen bei Verschlechterung des Allgemeinzustandes und Verdacht einer Bakteriämie und/oder einer Sepsis Blut abgenommen. Die Blutentnahme erfolgte an der Vena Jugularis mit einem Vacutainersystem (Belliver Industrial Estate, Plymouth, U.K.). 10 ml venöses Blut wurde entnommen und im veterinärmedizinischen Labor des Tierspitals Zürich hämatologisch und blutchemisch untersucht. In der Pilotphase-2 und -3 wurde zusätzlich das Vollblut an das Institut für Veterinärbakteriologie der Universität Zürich gesendet, um eine Blutkultur anzulegen.

### **3.8.4 Röntgenaufnahmen**

Postoperativ, 14 Tage nach der Operation und am Tag der Euthanasie wurden zwei Röntgenbilder angefertigt. Die Aufnahmen wurden mit einem mobilen Röntgengerät (2.5 Milliamperesekunden (mAs), 50 Kilovolt (kV), Orange 8016HF, Model: Superior SXR-80-14/10P, Focal spot 1.0mm x 1.0mm, Raymed, medical xray, Dürnten, Schweiz) und einer digitalen Röntgenplatte (FDR D-Evo II D35, Fujifilm AG, Dielsdorf, Schweiz) aufgenommen. Es wurde jeweils das operierte Hinterbein in medio-lateral (ML) und kranio-kaudaler (AP) Ebene abgelichtet. Mit den Röntgenaufnahmen wurde die Stellung der Schrauben und der Platte kontrolliert. Zusätzlich wurde die Muskulatur sowie das umliegende Gewebe auf Osteomyelitis bedingte periostale Knochenneubildung,

Gasdichte Aufhellungszonen und lytische Veränderungen entlang der Schraubengewinde überprüft. Bei starken klinischen Veränderungen oder zur Überprüfung der Lahmheitsursache wurden sicherheitshalber zusätzliche Röntgenbilder in den oben genannten Ebenen angefertigt und analysiert. Die Röntgenbilder wurden ohne Sedation angefertigt. Die Lagerung der Schafe erfolgte in einer sitzenden Position, wodurch die Aufnahmen zügig und möglichst stressfrei durchgeführt werden konnten.

### **3.9 Euthanasie**

Die Schafe der Pilotphase-1 wurde nach sieben Tagen, die Schafe der Pilotphase-2 und 3 nach 21 Tagen euthanasiert. Am Tag der Euthanasie wurde in die Vena Jugularis ein Venenkatheter (Angiocath Provet AG, Lyssach, Schweiz) gesetzt. Anschließend wurde den Schafen Pentobarbital intravenös injiziert (30mg/kg KGW, Esconarkon ad us. vet., Streuli Pharma AG Uznach, Schweiz). Nach einer negativen Auskultation des Herzens und negativem Pupillarreflex wurde der Tod festgestellt. Kurz darauf wurden Röntgenaufnahmen in ML und AP Ebenen angefertigt. Weiter wurden die Schafe der Pilotphase-1 in das Tötungslokal (für nicht lebensmittelliefernde Tiere) des Tierspitals Zürich zur Obduktion gebracht. Die Schafe der Pilotphase 2 und 3 wurde in der Pathologie des Tierspitals Zürich obduziert.

### **3.10 Probengewinnung und Auswertung**

#### **3.10.1 Probengewinnung und Aufbereitung der bakteriologischen Proben**

Zuerst wurden die Lymphonodi (Lnn.) inguinales und Lnn. poplitei jeweils der rechten und linken Seite, mit einem Schlachtermesser ausgeschnitten und mit einem Skalpell von umliegendem Fett und Gewebe freipräpariert.

Die Lymphknoten wurden mit Nummern versehen und zur Dokumentation fotografiert (Leica® DFC 420 C). Für die weitere Probenaufbereitung wurden die Lymphknoten in 4%iger Formalinlösung fixiert. Dann wurde die Operationswunde äußerlich beurteilt und auf das Vorhandensein von entzündlichen Reaktionen geachtet. Das operierte Bein wurde mithilfe eines Schlachtermessers im Hüftgelenk abgesetzt. Nach Eröffnung der Operationswunde wurde das Weichteilgewebe beurteilt sowie Anzeichen auf Abszessbildung. Alle Präparationsschritte wurde photographisch festgehalten und die Proben mit Studiennummern und Probennamen versehen. Die weitere Präparation und Entnahme der Knochenproben und Implantate wurde steril durchgeführt, um eine spätere

---

bakterielle Quantifizierung der invasiven Komponenten und der Knochenproben durchführen zu können.

Femur: der Überträger wurde mithilfe einer sterilen Pinzette aus der umliegenden Muskulatur und von der BISS-Schraube gelöst. Er wurde in ein Gefäß (50 ml Polypropylene Conical Tube von Corning Science Mexico S.A. de C.V. in Tamaulipas Mexico) gelegt und verschlossen. Die BISS Schraube wurde mit einem sterilen Meißel aus dem Femur entfernt, ebenfalls in ein 50 ml Gefäß verschlossen und der Femurdefekt wurde beurteilt.

Tibia: Auch hier wurden beide Überträger aus der Muskulatur und von den beiden Kortikalisschrauben mithilfe einer Pinzette gelöst. Die Überträger wurden in ein 50 ml Gefäß verschlossen. Die Kortikalisschrauben wurden mit einem sterilen Schraubenzieher aus dem Knochen gelöst und zusammen mit der Stahlplatte in einem 50 ml Gefäß verschlossen. Der Knochenblock aus der Tibia wurde entfernt, photographisch dokumentiert und anschließend mit einem Skalpell in der Mitte geteilt. Eine Hälfte wurde zur späteren bakteriellen Untersuchung in ein 50 ml Gefäß gelegt. Die andere Hälfte wurde für die histologische Untersuchung in 4%ige Formalinlösung eingelegt.

Tibia und Femur wurden frei gelegt, visuell geprüft und makroskopisch beurteilt. Die Art, Beschaffenheit und Konsistenz der Läsionen wurden beschrieben und mit repräsentativen Fotos dokumentiert. Anhaftende Sehnen und Muskulatur wurden entfernt. Die Knochenproben wurden mit einer Handsäge und einer Bandsäge aus der Tibia bzw. dem Femur herausgeschnitten. Dazu wurde parallel zur Längs- und Querachse der Tibia und des Femurs um den Bohrdefekt herum ein ca. 4x4 cm großer Knochenblock herausgesägt. Die Knochenproben wurden beschriftet und jeweils separat in 4%iger Formalinlösung eingelegt. Die gewonnenen Implantate und Knochenproben wurden zur bakteriellen Quantifizierung anschließend ins Universitätsspital, Zürich zur Weiterverarbeitung gebracht. In der Pilotphase-1 wurden alle Probenentnahmeschritte durchgeführt. Für die Pilotphase-2 und -3 wurde aufgrund veränderter Versuchsanordnung nur die Tibiakomponente vorgenommen.

### **3.10.2 Bakteriologische Quantifizierung**

Die bakterielle Kontamination der entnommenen Implantate, der Knochenstücke und des Gewebes wurden von PD Dr. med. Yvonne Achermann und Tiziano Schweizer im Universitätsspital Zürich quantitativ bestimmt.

### Implantatproben

Der Biofilm wurde durch Ultraschall vom Implantat abgelöst (siehe Abb. 3.8). Dafür wurde das Implantat in ein 50ml vorgelegtes Falcon Tube mit 30 ml PBS Lösung versetzt. Anschließend wurde es im Ultraschallbad (XUBA3, Grant Instruments) mit einer Intensität von 44 Kilohertz (kHz) über den Zeitraum von 1 Minute mit Ultraschallwellen behandelt.

### Gewebe/Knochenproben

Die Knochenstücke und das Gewebe wurden mit einem Skalpell zerkleinert, in je ein Falcon Tube gefüllt und anschließend gewogen (siehe Abb. 3.8.). Die gewogene Menge wurde mit der dreifachen Menge Thioglycolat-Nährbouillon befüllt, gründlich durchmischt und homogenisiert.

Mit den Suspensionen des Biofilm- Implantates, der Knochenstücke und des Gewebes wurde danach weiter gleich fortgefahren.

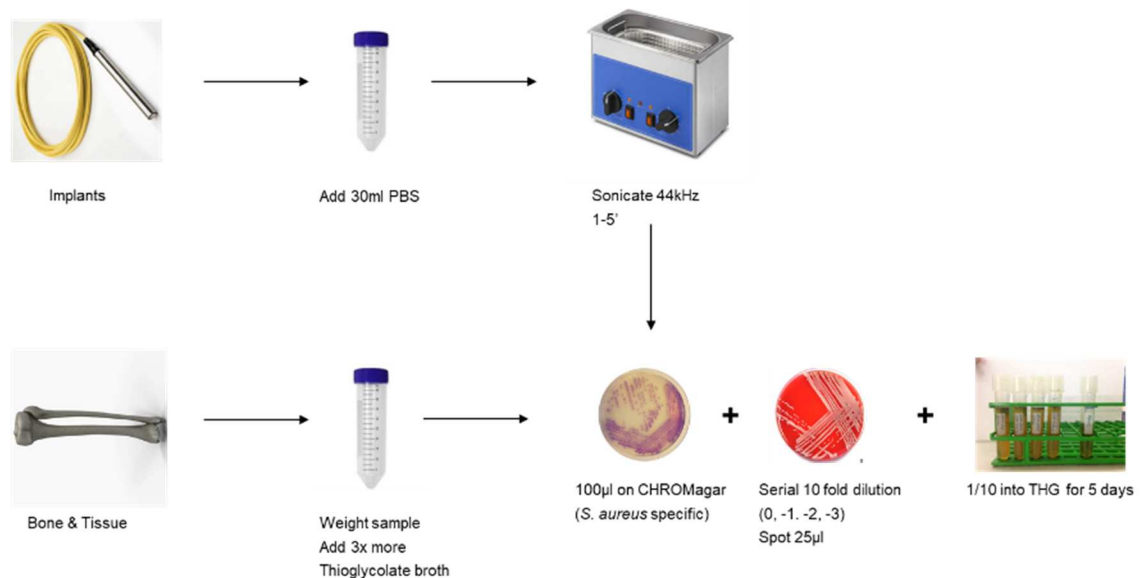


Abbildung 3.8: bakteriologische Aufbereitung der Proben Quelle Universitätsspital Zürich

Die Bakterienzahl wurde bestimmt, indem eine 10-fache dekadische Verdünnungsreihe angelegt wurde. Es wurde eine Columbia Blut-Agarplatte mit jeweils 25 µl Suspension ausplattiert und anschließend für 24 Stunden bei 37 Grad bebrütet. Die Kolonien wurden ausgezählt und der Mittelwert aus den technischen Replikaten errechnet.

Um Kontaminationen auszuschließen und die *S. aureus* Spezifität zu testen, wurden je Probe 100 µl Suspension auf CHROMagar™ (Becton-Dickinson) ausplattiert und inkubiert.

---

Weiter wurden die Suspensionen im Verhältnis 1:10 mit Thioglycolat -Nährbouillon inokuliert und bei 37 Grad für 5 Tage inkubiert.

### **3.10.3 Probengewinnung und histologische Aufbereitung**

Die formalinfixierten Lymphonodi (Lnn.) Inguinales und Lnn. Poplitei wurden nach 24 Stunden unter fließendem Wasser gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100%- mit Leica® Entwässerungsautomat, Histoprocessor ASP200S, Leica Instruments GmbH, Solms, Deutschland) entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden Dünnschnitte mit einem Schnittmikrotom (Leica® Typ 2500, Leica Instruments GmbH, Deutschland) von ca. 0.3-0.5mm Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Für eine Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung wurden die Schnitte in ein Objektträgergestell gestellt und dieses jeweils komplett in die HE befüllte Küvette eingetaucht. Es folgte die Trocknung der Objektträger.

Die Knochenproben wurden zur Vorbereitung auf die Entkalkung aus dem gepufferten 4%igen Formalin entnommen und für ca. eine Stunde unter fließendem Wasser gewaschen. Es folgte eine Dekalzifizierung der Proben mit Milder Entkalker RDF (LOT no.03812165, Ref. EAA-1000-00A, CellPath Ltd, Newtown, UK) für mindestens drei Wochen. Nach der Fixierung wurden die Proben erneut gewaschen und zur Dehydration in einer aufsteigende Alkoholreihe (70-100% mit Leica® Histoprocessor ASP200s) entwässert. Mit Xylol als Intermedium wurden die Proben entfettet und in Paraffin eingebettet. Aus den gewonnenen Paraffinblöcken wurden 0.3-0.5 mm Dünnschnitte mit dem Schnittmikrotom (Leica® Typ 2500, Leica Instruments GmbH, Solms, Germany) angefertigt und wiederum auf Objektträger aufgezogen. Als Übersichtsfärbung wurde eine HE Färbung gewählt zur Darstellung von Knochengewebe und Gewebereaktionen. Eine Toluidinblau (TolB) Färbung wurde zusätzlich angefertigt und die Brown-Brenn-Färbung (modifizierte Gram-Färbung) wurde zur Darstellung von Bakterien gewählt.

Zur TolB-Färbung wurde mit Ameisensäure (0.7%ig, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) die Oberfläche der Dünnschnitte aufgeraut. Anschließend wurden die Schnitte in einen Farbe-Einsatz gestellt und der komplett in die entsprechende Küvette eingetaucht. Nach der Färbung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für mindestens 30 Minuten getrocknet.

Zur Brown-Brenn-Färbung wurden die Schnitte mit einer frischen Kristallviolett-Gebrauchslösung für eine Minute beschichtet. Darauf folgte eine Waschung unter fließendem Wasser. Die Schnitte wurden mit Lugolscher Lösung für eine Minute



beschichtet und erneut unter Fließwasser gespült. Die Schnitte wurden zur Trocknung zwischen Filterpapier gelegt. Mit einem Verhältnis von 1:1 Aether-Aceton wurden die Schnitte entfärbt und luftgetrocknet. Für 5 Minuten wurden die Schnitte in Fuchsin-Lösung angefärbt und wieder in Aceton gelegt. Zur Differenzierung wurde Pikrinsäure hinzugefügt und wiederholt in Aceton getaucht. Abschließend wurden die Schnitte getrocknet, mit Xylol beschichtet und eingedeckt. Sie wurden mithilfe eines Lichtmikroskop histologisch untersucht und ausgewertet.

### **3.11 Histologische Auswertung**

Anhand eines Bewertungsbogens wurden alle Dünnschnitte am Lichtmikroskop (Leica® M420, Leica Microsystems, Glattbrugg, Schweiz) bei verschiedenen Vergrößerungen evaluiert. Es wurde ein semiquantitativer Bewertungsbogen für die Lymphknoten-Dünnschnitte erstellt. Bei den Lymphknoten galt besonderes Interesse den Strukturabweichungen zu physiologischen Strukturen, Anwesenheit von Entzündungszellen sowie das Vorkommen von Bakterien. Die Bewertung der Befunde erfolgte anhand von Bewertungsbogen Lymphknoten (Anhang Tabelle 8.4).

Die Dünnschnitte der Knochenproben (Schraubenlöcher, Knochendefekt, Knochenblock) wurden ebenfalls mit einem Bewertungsbogen evaluiert. Bewertet wurden Anzeichen einer akuten Entzündung (akute entzündliche Komponente) mit oder ohne Abszess Bildung und eine chronische Entzündung (Lymphozyten und Plasmazellen) mit Aufbau von Granulationsgewebe und/oder Fibrose. Zusätzlich wurden Knochennekrosen und die Anwesenheit von Bakterien ausgewertet. Die Veränderungen wurden anhand Bewertungsbogen Knochen (Anhang Tabelle 8.5) bewertet.

Bei einem Schaf der dritten Pilotphase wurde zusätzlich eine Abszess Kapsel histologisch aufbereitet und ausgewertet.

### **3.12 Statistik**

Aufgrund der kleinen Anzahl an Versuchstieren wurde keine statistische Auswertung durchgeführt.

---

## 4 Resultate

### 4.1 Anästhesie

#### 4.1.1 Anästhesie Pilotphase-1

Die Anästhesien verliefen bei beiden Tieren planmäßig und ohne Komplikationen. Ein Tier (101.01) erhielt direkt nach der Operation Atipamezol, (Antisedan® ad. us. vet Injektionslösung, 0,034 mg/kg KGW, i. m., mit dem Verhältnis 1:3 zu Medetomidin) ein Antagonist gegen die Medetomidin Anästhesie, um die Sedation somit schneller aufzuheben.

#### 4.1.2 Anästhesie Pilotphase-2

Die Anästhesien verliefen bei beiden Tieren wie geplant.

#### 4.1.3 Anästhesie Pilotphase-3

Auch in dieser Pilotphase verliefen die Anästhesien nach Plan und ohne jegliche Zwischenfälle. Beide Tiere erhielten im Stall Atipamezol (Antisedan® ad. us. vet Injektionslösung, i. m., mit dem Verhältnis 1:3 zu Medetomidin). Das Schaf 101.05 erhielt 0,04 mg/kg KGW und das Schaf 101.06 erhielt 0,023 mg/kg KGW Atipamezol.

### 4.2 Operativer Eingriff

#### 4.2.1 Operativer Eingriff Pilotphase-1

Die Operation der beiden Schafe verlief planmäßig. Die Operationsdauer betrug im Durchschnitt 61.5 Minuten. Die im Universitätsspital vorbereiteten Inokula kamen planmäßig am Tierspital an und konnten in die Knochendefekte (siehe Abb. 4.1) eingebracht werden. Jedes injizierte Inokulum hatte eine *S. aureus* Konzentration von  $2,00E+05$  mit Volumen von 100  $\mu$ l. Nach dem Einsetzen des Inokulums wurden die sterilen Handschuhe planmäßig gewechselt. Die der Tibia entnommenen Knochenblöcke wurden mit einem sterilen Zentimeterstab gemessen. Sie betrugen bei ersten Tier (101.01) (Länge): 0.8cm, B (Breite): 0.7cm, H (Höhe): 0.5cm und beim zweiten Tier (101.02) L: 0.9cm, B: 0.8cm, H: 0.55cm. Nach Einsetzen der Kortikalisschrauben (14mm Länge) in die Tibia, wurde bei beiden Tieren mit einem Multimeter der Widerstand gemessen. Der Widerstand betrug bei dem ersten Tier (101.01) 98,2  $\Omega$  (Ohm) und beim zweiten Tier (101.02) 97,7  $\Omega$ . Bei 101.01 wurde das linke Hinterbein, bei 101.02 das rechte Hinterbein operiert.

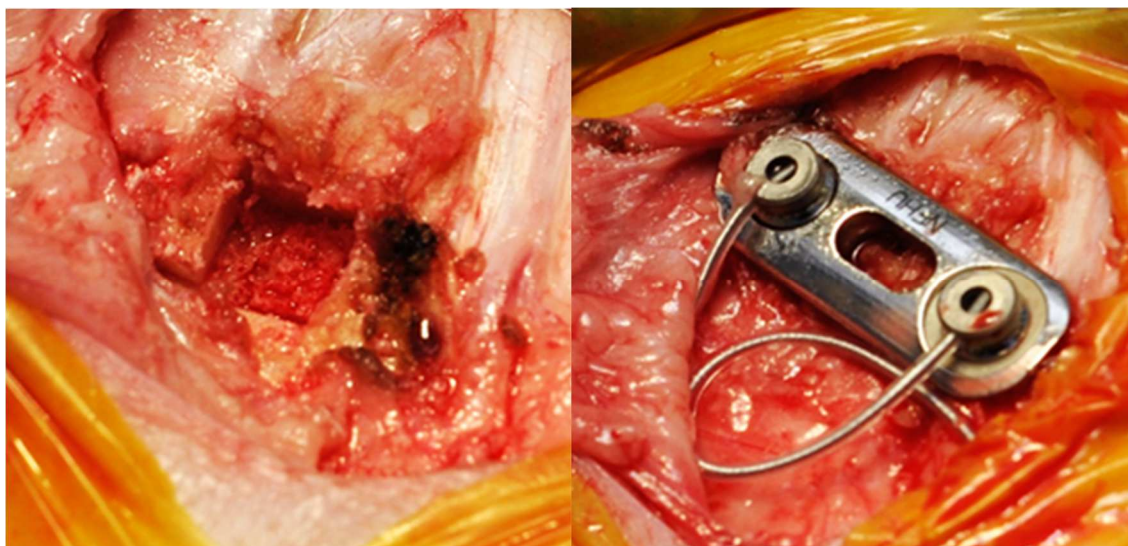


Abbildung 4.1: li: Tibia-Defekt; re: Defekt mit befestigtem Implantat an der Tibia von Tier 101.01

#### 4.2.2 Operativer Eingriff Pilotphase-2

In der Pilotphase-2 betrug die Operationsdauer im Durchschnitt 42,5 Minuten. Die Operationszeit verkürzte sich stark, da das Operationsteam routinierter war, alle Operationsschritte planmäßig durchgeführt werden konnten und nur der Tibiadeфекt gesetzt wurde. Der ausgemessene Knochenblock betrug bei einem Tier (101.03) L: 0.8cm, B: 0.7cm, H: 0.5cm und bei dem anderen Tier (101.04) L: 0.9cm, B: 0.7cm und H: 0.5cm. Beiden Tieren wurde je ein Inokulum mit einer Konzentration von  $2,00E+04$  und dem Volumen von 20  $\mu$ l in den Tibiadeфекt injiziert. Nach dem Anbringen der Überträger wurde nur bei einem Tier (101.04) der Widerstand mit  $95,5 \Omega$  (101.04) gemessen. Es fiel auf, dass der Knochen bei dem Schaf 101.04 weicher erschien (Anmerkung vom Chirurgen). Zudem blutete das Schaf während der Operation verstärkt.

#### 4.2.3 Operativer Eingriff Pilotphase-3

Alle Operationsschritte wurden planmäßig eingehalten. Die durchschnittliche Operationsdauer betrug 53 Minuten. Der gemessene Knochenblock betrug bei Schaf 101.05 L: 0.8cm, B: 0.6cm, H: 0.4cm und bei Schaf 101.06 L: 0.6cm, B: 0.6cm, H: 0.5cm. Das eingesetzte Inokulum betrug bei beiden Defekten planmäßig  $2,00E+04$  in 20  $\mu$ L Volumen. Der Überträger hatte bei Schaf 101.05 einen Widerstand von  $97,3 \Omega$  und bei Schaf 101.06  $98,6 \Omega$ . Bei Schaf 101.06 saß die kaudale Kortikalisschraube nach dem Einsetzen zu locker und wurde durch eine neue Kortikalisschraube ersetzt. Durch das doppelte Einschrauben, weitete sich das Bohrloch, sodass auch die ersetzte Schraube geringgradig gelockert im Knochen sass. Die Operationsdauer in der Pilotphase-3 betrug im Durchschnitt 56 Minuten.

---

## **4.3 Postoperatives Management**

### **4.3.1 Postoperatives Management Pilotphase-1**

Die Aufwachphasen der beiden Tiere verlief ohne Komplikationen. Bis die Schafe selbstständig stehen und Futter zu sich nehmen konnten, vergingen im Durchschnitt 50 Minuten post OP. Im Stehen belasteten beide Tiere alle vier Gliedmaßen. Nur Tier 101.01 erhielt direkt nach der Operation Atipamezol (Antisedan® ad. us. vet, 0.034 mg/kg KGW, i. m. im Verhältnis zu Medetomidin 1:3). Schaf 101.02 erwachte aus der Sedation sehr schnell selbstständig.

### **4.3.2 Postoperatives Management Pilotphase-2**

Beide Schafe erholten sich schnell von der Operation. Innerhalb einer Stunde nach der Operation konnten beide Schafe gehen, belasteten alle vier Gliedmaßen gleichmäßig und nahmen selbstständig Futter auf.

### **4.3.3 Postoperatives Management Pilotphase-3**

Die Aufwachphase verlief mit der Gabe von Atipamezol (Antisedan® ad. us. vet, 101.05: 0,04 mg/kg KGW; 101.06: 0,023 mg/kg KGW, i. m. im Verhältnis zu Medetomidin 1:3) ruhig und unkompliziert. Beide Schafe konnte zügig selbstständig stehen, mit einer geringgradige Lastaufnahme des operierten Hinterbeines. Schaf 101.05 nahm erst eine Stunde post OP Futter auf.

## **4.4 In-Life-Phase und Medikation**

Eine detaillierte Übersicht der klinischen Einstufungen sowie der angewendeten Schmerzmedikation kann den Tabellen 8.12 bis 8.15 im Anhang entnommen werden:

### **4.4.1 In-Life-Phase und Medikation Pilotphase-1**

Ab dem ersten Tag post OP wurde eine verminderte Lastaufnahme der operierten Gliedmaße mit Zehenspitzenstellung und eine moderate Steifheit im Kniegelenk bei beiden Tieren festgestellt (siehe Tab. 4.1). Die OP Wunde war vermehrt rot, geschwollen und deutlich schmerzhaft. In den folgenden Tagen steigerte sich die Schmerzhaftigkeit der OP-Wunde und Lahmheit der operierten Gliedmaße weiter und erreichte den Peak am fünften Tag post OP (Anhang Tabelle 8.6 und 8.7). Erschwerend kam hinzu, dass sich Schaf 101.02 eine Zerrung des M. tibialis cranialis und M. semitendinosus, durch vermutliches Ausrutschen (ein Tag post OP) auf dem neuen Stallboden, zuzog. Bei

diesem Schaf wurden zusätzlich ein vermehrt reduziertes Allgemeinbefinden und eine deutliche Schmerzhaftigkeit der gesamten Hintergliedmasse beobachtet. Die betroffenen Muskeln waren geschwollen und verhärtet. Eine Röntgenaufnahme, die zur Kontrolle des Knochens und der Implantate gemacht wurde, zeigte keine Auffälligkeiten. Zusätzlich zu der täglichen Carprofen (Rimadyl®, 4 mg/kg BW) Medikation wurde zweimal täglich eine Paracetamol Infusion (10mg/kg KGW in 100ml 0.9 %NaCl) bei Schaf 101.01 am Tag fünf und sechs und bei Schaf 101.02 von Tag zwei bis Tag sechs post OP durchgeführt. Diese Schmerzmedikation zeigte jedoch nicht den gewünschten schmerzreduzierenden Effekt. Lahmheit der operierten Gliedmaße und Schmerzhaftigkeit der OP Wunde blieben trotz Schmerzmedikation bei beiden Tieren bestehen. Es wurde ab dem fünften Tag eine Buprenorphin (Temgesic®, 0,2 mg/kg KGW i. m., Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) Medikation, dreimal täglich alle acht Stunden angeordnet. Das allgemeine Verhalten verbesserte sich daraufhin, und die OP Wunden waren weniger schmerzhaft. Um eine systemische Infektion auszuschließen, wurde eine Überprüfung des Hämatokrits und der Blutchemie durchgeführt sowie eine Blutkultur am Tag sechs post OP angereichert. Die Blutbefunde zeigten keine Hinweise auf eine Septikämie. Bei Schaf 101.02 wurde eine geringgradige Anämie festgestellt. Da die Schafe trotz Buprenorphin Medikation (beim Nachlassen der vollen Wirkung) weiterhin hochgradig lahmten, eine deutliche Zehenfußstellung und Schmerzhaftigkeit an der OP Wunde zeigten, wurden am siebten Tag aus Tierschutzgründen beide Schafe euthanasiert und die Pilotphase-1 vorzeitig abgebrochen.

Tier	Tag	Kommentar
101.01	0.-4.	das Allgemeinbefinden des Schafes ist gut; das operierte Bein wird belastet, die Gangart ist ggr. abnormal (Kniegelenk ist steif); die Region um die Wundnaht ist ggr. warm
	5.-7.	deutlich reduzierte Belastung des operierten Beines, Blutbefund: obB; vor der Buprenorphin Gabe: operierte Bein hgr. schmerzhaft, Appetit herabgesetzt, apathisch, nach der Buprenorphin Gabe ist das Bein nur ggr. schmerzhaft und der Appetit ist gut
101.02	0.-4.	Appetit ist herabgesetzt; das Schaf hat Probleme auf dem rutschigen Boden zu laufen, M. tibialis cranialis ggr. verhärtet und geschwollen; ggr. bis keine Belastung des operierten Beines, herabgesetzter propriozeptive Reflex; OP Wunde ist rötlich, geschwollen aber trocken
	5.-7.	kaum Belastung auf dem operierten Bein, Blutbefund im Referenzbereich, nur eine ggr. Anämie, vor der Buprenorphin Gabe operierte Bein hgr. schmerzhaft, meist keine Belastung des operierten Beines, apathisch, nach der Buprenorphin Gabe gute Belastung des operierten Beines und guter Appetit, OP Wunde weniger schmerzhaft.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung klinischen Beobachtungen der In-Life-Phase Pilotphase-1

#### 4.4.2 In-Life-Phase und Medikation Pilotphase-2

Die Schafe dieser Pilotphasen gehörten zu der Kontrollgruppe. Ab dem ersten Tag post OP wurde die Feldspule zweimal täglich an die operierte Gliedmaße für je 90 Minuten gehängt. Die Feldspulen wurden dabei aber nicht an die Generatoren angeschaltet. Die Feldspule wurde während des Tragens gut toleriert. Die Schafe zeigten in den ersten Tagen post OP eine herabgesetzte Lastaufnahme der operierten Gliedmaße, eine mittelgradige Lahmheit und ein geringgradiges herabgesetztes Allgemeinverhalten (siehe Tab. 4.2). Das Schaf 101.04 zeigte eine deutlichere Lahmheit mit Zehenfussung und überdurchschnittlich lange Liegephasen ab dem ersten Tag post OP. Die OP Wunde war bei beiden Tieren moderat geschwollen und gerötet (Anhang Tab. 8.8 und 8.9). Die Wunde war zudem geringgradig wärmer als die Peripherie. Die Wundnaht war während der gesamten Pilotphase ohne Flüssigkeitsaustritt geschlossen und trocken. Ab dem dritten bis sechsten Tag wurde die Lahmheit bei beiden Tieren deutlicher, mit einer deutlichen verringerten Lastaufnahme der operierten Gliedmaße und Zehenspitzenfussung. Die OP-Wunde war sichtbar gerötet, moderat geschwollen und vermehrt warm. Wegen zusätzlich reduzierten Allgemeinverhaltens wurde eine Blutuntersuchung und Blutkultur durchgeführt. Die Blutbefunde waren bei beiden Tieren im Referenzbereich.

Die Schafe erhielten an den ersten vier Tagen einmal täglich Carprofen (Rimadyl®, 4 mg/kg KGW). An den Tagen fünf und sechs wurde die Carprofen Gabe ausgesetzt, doch wegen der deutlichen Steigung der Entzündungszeichen an der OP Wunde, wurde die Carprofen Medikation am Tag sieben bis elf mit einer einfachen Dosierung (4mg/kg

KGW) und ab Tag zwölf mit der halben Dosierung (2mg/kg KGW) fortgesetzt. Da in der Pilotphase-1 die Schmerzreduzierung mit Buprenorphin bei einer akuten Knochenentzündung erfolgreich war, erhielt Schaf 101.03 ab dem zweiten Tag und Schaf 101.04 ab dem dritten bis zehnten Tag post OP dreimal täglich Buprenorphin (Temgesic®, 0,2 mg/kg KGW i. m., Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz). Am elften Tag nur noch einmal täglich. Danach wurde die Buprenorphin Medikation eingestellt.

Zwischen dem dritten und sechsten Tag waren beide Tiere weiterhin deutlich lahm, das allgemeine Verhalten war reduziert und die Wunde war deutlich geschwollen und rötlich. Um eine systemische Infektion auszuschließen wurde der Hämatokrit und die Blutchemie bestimmt und eine Blutkultur angesetzt. Die Blutbefunde waren ohne besonderen Befund und zeigten keinerlei Hinweise auf eine systemische Infektion. Da das allgemeine Verhalten weiterhin herabgesetzt und die OP Wunde deutlich schmerzhaft war (trotz Buprenorphin Medikation), wurde die Feldspule am siebten und achten Tag nicht angelegt, damit die Tiere sich schneller erholen konnten. Aufgrund der starken Schmerzhafteigkeit wurde bei Schaf 101.04 am siebten Tag die Buprenorphin Dosis einmalig in doppelter Dosis (0,02 mg/kg KGW) verabreicht. In den folgenden Tagen stabilisierten sich beide Tiere. Beide zeigten nur noch eine geringgradige Schmerzhafteigkeit an der operierten Gliedmasse, die Lahmheit war geringgradig sichtbar und alle Entzündungszeichen an der OP Wunde verringerten sich. Aufgrund der schnellen Besserung, wurde ab dem zwölften Tag Carprofen bis zum 21. Tag nur noch in halber Dosis (2 mg/kg KGW) injiziert. Bis zum Ende der Pilotphase 2 zeigten beide Tiere nur eine geringgradige bis keine Lahmheit, alle Gliedmaßen wurden belastet, weiter war nur noch eine geringe Sensitivität an der OP Wunde festzustellen. Bei Schaf 101.04 wurde an einigen Tagen eine geringgradige Schwellung an der operierten Gliedmaße festgestellt. Diese war nicht persistierend.

Tier	Tag	Kommentar
101.03	0.-4.	Appetit gut; Tag 1 post OP anhängen der Feldspule, ggr. Belastung des operierten Beines und intermittierende Zehenfussung; moderate Schwellung und Rötung der ROI
	5.-7.	gutes Allgemeinverhalten, verbesserte Belastung des operierten Beines, keine Zehenfussung mehr, Blutbefunde und Blutkultur obB (keine Sepsis), moderate Schwellung und Rötung der Wunde, aufgrund reduziertem Allgemeinverhalten und hgr. Lahmheit an zwei Tagen, Anhängen der Feldspule wird ausgesetzt
	7.-14	gutes Allgemeinverhalten, ggr. Lahmheit, nach Abhängen der Feldspule wird eine ggr. Steifheit des operierten Beines beobachtet; ggr. sensitiv und schmerzhaft an ROI, keine Schwellung und Rötung mehr
	14.-21.	gutes Allgemeinverhalten, alle Gliedmaße werden belastet, lahmfrei, keine Rötung/Schwellung/ Wärme der ROI
101.04	0.-4.	Allgemeinverhalten obB, Tag 1 post OP anhängen der Feldspule, Zehenfussung des operierten Beines, lange Liegephasen, Wunde ist moderate gerötet und geschwollen; ROI ist ggr. wärmer als die Peripherie
	5.-7.	Belastung des operierten Beines hat sich verbessert, Wunde ist weniger schmerzhaft, moderate geschwollen und trocken. An Tag 7 aufgrund verschlechterten klinischen Allgemeinverhaltens doppelte Buprenorphin Gabe erforderlich.
	8.-14.	Schaf liegt viel, ist aber weniger schmerzhaft, ggr. schmerzhaft an ROI
	15.-21.	Appetit gut, aufmerksam, alle Gliedmaße werden belastet, nach einer Liegephase ggr. Steifheit im operierten Bein, Wunde ggr. geschwollen, ROI ist nicht mehr schmerzhaft

Tabelle 4.2: Zusammenfassung klinischen Beobachtungen der In-Life-Phase Pilotphase-2

#### 4.4.3 In-Life-Phase und Medikation Pilotphase-3

In der Pilotphase-3 wurde die PEMF Therapie zweimal täglich für je 90 Minuten durchgeführt. Die Therapie fand an allen Tagen statt und wurde gut toleriert. An den ersten Tagen nach der OP war das Allgemeinverhalten bei beiden Tieren reduziert (siehe Tab. 4.3). Sie zeigten eine moderate Lahmheit und überdurchschnittlich lange Liegephasen. Die OP Wunde war geringgradig wärmer als die Peripherie, geringgradig bis mittelgradig gerötet und deutlich sensitiv bei Berührungen an der Naht (Anhang Tab. 8.10 und 8.11). Anmerkung: in dieser Pilotphase wurde der Osteomyelitis Bewertungsbogen angepasst und die Schmerz Sensitivität an der operierten Gliedmaße mit beurteilt. Ab dem dritten Tag post OP steigerte sich die Lahmheit, hinzu kam noch eine mittelgradig verminderte Lastaufnahme und eine Zehenspitzenfussung des operierten Beines. Bei Schaf 101.05 wurde bemerkt, dass die OP Naht wulstig war und sich das Tier nach der Feldspulen Therapie steif bewegte. Der Grund war, dass die OP Naht innen an dem Coil rieb. Die Entzündungszeichen und das reduzierte Allgemeinbefinden erreichten an Tag fünf und sechs den Höhepunkt.

Aufgrund der verstärkten Lahmheit bekamen die Tiere, zusätzlich zu der täglichen normalen Dosis Carprofen, noch dreimal täglich Buprenorphin (von Tag fünf bis Tag



neun). Danach verbesserte sich wieder der Zustand beider Schafe. Schaf 101.05 zeigte ab dem zehnten Tag und 101.06 ab dem 15. Tag keine Lahmheit mehr, eine normale Sensitivität und keine Rötungen an der OP Wunde mehr. Die Lastaufnahme aller Gliedmaßen war gut. Die Buprenorphin Medikation wurde bei beiden Tieren ab dem zehnten Tag abgesetzt und ab dem 16ten Tag die Carprofen Dosierung auf die Hälfte (2 mg/kg KGW) reduziert.

Tier	Tag	Kommentar
<b>101.05</b>	0.-4.	Schaf ist aufmerksam, aber reduziertes Allgemeinverhalten, überdurchschnittlich lange und häufige Liegephasen, Zehenfassung mit operiertem Bein, Tag 1 startet PEMF Therapie, nach der Therapie wird das operierte Bein nur ggr. belastet (wulstige OP Naht drückt und reibt von innen gegen die Feldspule)
	5.-7.	reduziertes Allgemeinverhalten, ggr. und sehr vorsichtige Belastung mit operiertem Bein
	8.-14.	gutes Allgemeinverhalten, gute Belastung des operierten Beines, Gangbild ist recht vorsichtig
	15.-21.	Belastung aller Gliedmaße im Gehen und Stehen, Lahmfrei
<b>101.06</b>	0.-4.	reduziertes Allgemeinverhalten, beim Gehen: Zehenfassung mit operiertem Bein, ab Tag 1 PEMF Therapie
	5.-7.	reduziertes Allgemeinverhalten, Appetit gut, Zehenfassung mit operiertem Bein wird fortgeführt, vorsichtiges Gangbild, überdurchschnittliche lange Liegephasen
	8.-14.	Allgemeinverhalten und Appetit gut, besser Belastung des operierten Beines beim Stehen und Gehen
	15.-21.	gutes Allgemeinverhalten und gute Aufmerksamkeit, gute Belastung aller Gliedmaße, nur ggr. Steifheit des operierten Beines

Tabelle 4.3: Zusammenfassung klinischen Beobachtungen der In-Life-Phase Pilotphase-3

## 4.5 Blutanalyse Auswertung

### 4.5.1 Blutanalyse Auswertung Pilotphase-1

Routinemäßig wurde vor der OP und außerplanmäßig am Tag 6 post OP die Hämatologie und Blutchemie bei beiden Schafen überprüft. Die bestimmten Blutparameter befanden sich in den Referenzbereichen. Eine außerplanmäßige Blutabnahme erfolgte nach einer andauernden Verschlechterung des allgemeinen Zustandes und hochgradiger Lahmheit beider Tiere.

### 4.5.2 Blutanalyse Auswertung Pilotphase-2

In der Pilotphase-2 wurde in der Akklimationsphase und am Tag 7 nach der Operation Blut entnommen. Bei beiden Tieren war das Blutbild vor der Operation ohne besonderen

---

Befund. Aufgrund der Verschlechterung des Allgemeinbefindens und der deutlichen Lahmheit wurde am Tag 7 nach der Operation eine Blutchemie und Hämatokrit angefordert. Bei Schaf 101.04 wurde eine geringgradige Anämie festgestellt. Weiter wurde bei beiden Tieren eine Blutkultur durchgeführt. Bei beiden Tieren wurden keine aeroben oder anaeroben Keime nachgewiesen und somit konnte eine Septikämie ausgeschlossen werden.

#### **4.5.3 Blutanalyse Auswertung Pilotphase-3**

In der Pilotphase-3 wurde routinemäßig die Hämatologie und Blutchemie beider Tiere prae OP untersucht. Die untersuchten Blutparameter befanden sich im angegebenen Referenzbereich.

### **4.6 Röntgen**

#### **4.6.1 Röntgen Auswertung Pilotphase-1**

Beide Schafe wurden planmässig postoperativ und postmortal (Tag 7) geröntgt. Nach einer Zerrung des operierten Hinterbeines (101.02) mit den betroffenen Musculus tibialis cranialis und Musculus semitendinosus wurde eine Röntgenaufnahme im medio-lateralen Strahlengang zur Kontrolle (Tag 2 post OP) angefertigt. Alle Röntgenbilder zeigten, dass die gesetzten Implantate sich in angestrebter Position befanden. Weiter wurde keine Knochenlyse um die Schrauben festgestellt.

#### **4.6.2 Röntgen Auswertung Pilotphase-2 und -3**

Die operierten Hinterbeine aller Schafe (101.03-101.06) wurden planmäßig post OP, am Tag 14 post OP und postmortal (siehe Abb. 4.2) am Tag 21 in 2 Ebenen (medio-lateral und kranio-kaudal) geröntgt. Die gesetzten Implantate und Defekte befanden sich zu allen Röntgenzeitpunkten in Position. Die Radiographien entsprachen 2 Wochen nach der Operation und post mortem den postoperativen Aufnahmen. Es wurde keine Knochenlyse oder ein Zeichen einer Osteomyelitis festgestellt.

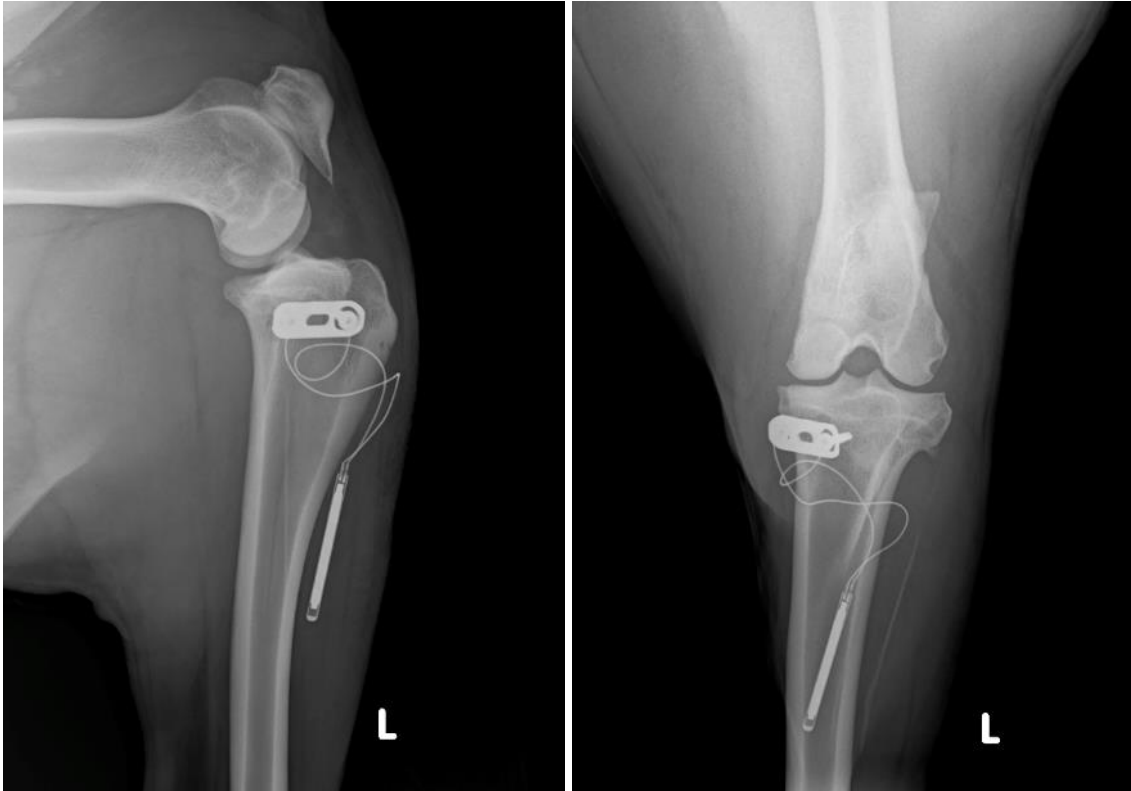


Abbildung 4.1: Kontrollradiographie Tier 101.06, Woche 3 postmortal; li: medio-lateral; re: kranio-kaudal

## 4.7 Euthanasie

### 4.7.1 Euthanasie Pilotphase-1

Am siebten Tag post OP wurden beide Tiere von einem Senior Veterinärmediziner untersucht und nach der eingehenden Untersuchung aufgrund anhaltend starker Schmerzhaftigkeit und Lahmheit des operierten Beines beider Tiere und des anhaltenden, reduzierten Allgemeinbefindens und Apathie (101.02) wurde entschieden die Euthanasie beider Tiere vorzuziehen.

Die Euthanasie wurde ohne Komplikationen durchgeführt. Die Obduktion wurde unter Einhaltung der Biosafety Schutzmaßnahmen durchgeführt.

### 4.7.2 Euthanasie Pilotphase-2 und -3

Die Euthanasie verlief bei allen Tieren nach Plan und ohne Komplikation. Die Obduktion fand in der Pathologie des Tierspital Zürich statt.

---

## 4.8 Makroskopische Beurteilung

### 4.8.1 Makroskopische Beurteilung Pilotphase-1

Makroskopisch konnte bei Tier 101.01 eine geringgradige Schwellung rund um die Wundnähte der Tibia und des Femurs begutachtet werden. Die Haut war trocken und nicht gerötet. Bei Tier 101.02 wurde eine mittel- bis hochgradige Schwellung festgestellt. Beim Eröffnen des ursprünglichen Operationsbereiches und nach der Entfernung der Haut und Unterhaut, wurde ein stechend-fauliger Geruch bei der Freipräparierung der Muskulatur wahrgenommen (101.02). Weiter wurde eine Infektion festgestellt, die sich von der Unterhaut bis zum medialen Teil der Tibia durchzog. An der lateralen Seite des Musculus tibialis cranialis waren nekrotische Areale sichtbar.

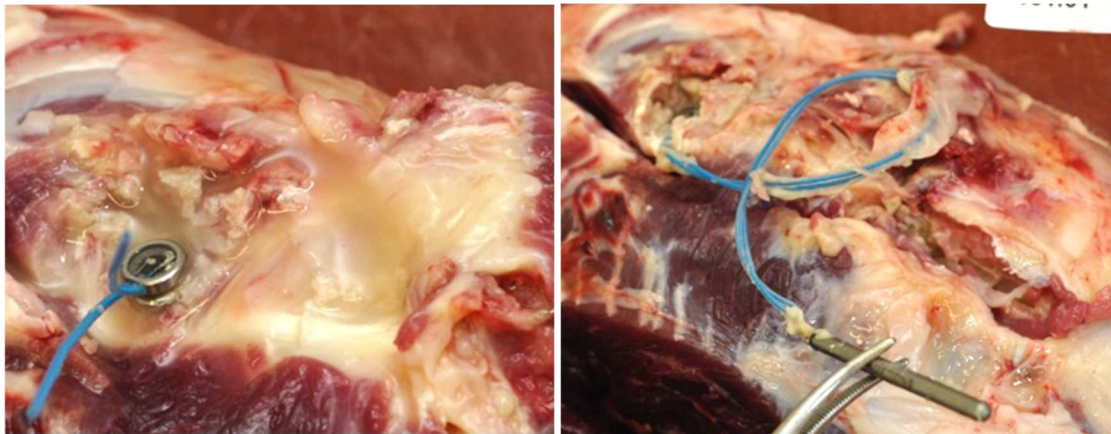


Abbildung 4.2: Tier 101.01, li: hgr. infiziertes Gewebe mit eingesetzter Schraube im Femur; re: Implantat & Überträger eingebettet im „Kanal“ von Bakterien

In der Region rund um den medialen Femurkondylus und an der BISS Schraube, war bei beiden Tieren nekrotisches und lytisches Weichteilgewebe sowie fadenziehender, trüber Eiter auffindbar (siehe Abb. 4.3). Bei der Kniegelenkeröffnung wurde vermehrte gelb gefärbte Synovialflüssigkeit sichtbar (bei beiden Tieren). Bei Tier 101.02 war die Gelenksflüssigkeit schon vor Gelenkeröffnung an der BISS Schraube sowie entlang der Überträgerkabel sichtbar. Es wurde mit einer sterilen Spritze eine Probe entnommen. Die Überträgerkabel waren bei beiden Tieren eingebettet in nekrotischem und lytischem Weichteilgewebe, der Musculus tibialis cranialis war ebenfalls betroffen.

An der Tibia war die Oberfläche des Musculus tibialis cranialis ebenfalls lytisch und nekrotisch. Das Gewebe auf der Stahlplatte war nur geringgradig nekrotisch. Bei Tier 101.02 waren die Nekrosen des Weichteilgewebes und die sich in Lyse befindende

Muskulatur hochgradig verändert. Der Knochenblock war osteolytisch und konnte einfach entnommen werden.

#### 4.8.2 Makroskopische Beurteilung Pilotphase-2

Nach der Eröffnung des ursprünglichen Operationsbereiches wurde bei Tier 101.04 eine Schwellung des tiefen Weichteilgewebes sowie eine rötlich verfärbte Faszie des Musculus tibialis cranialis sichtbar.

Über der eingesetzten Stahlplatte und entlang der Überträgerkabel waren lokalisierte Abszesse bei beiden Tieren zu finden (siehe Abb. 4.4). Die Überträger-Clips befanden sich bei allen Schrauben in Position. Bei beiden Tieren hatten sich die Schrauben gelockert. Die Schraubenlöcher waren infiziert und hochgradig osteolytisch. Der Knochenblock war ebenfalls osteolytisch. In dem Tibiadeфекt kam fibrotisches Gewebe (101.04) zum Vorschein. Die Kniegelenke beider Tiere waren nicht infiziert.

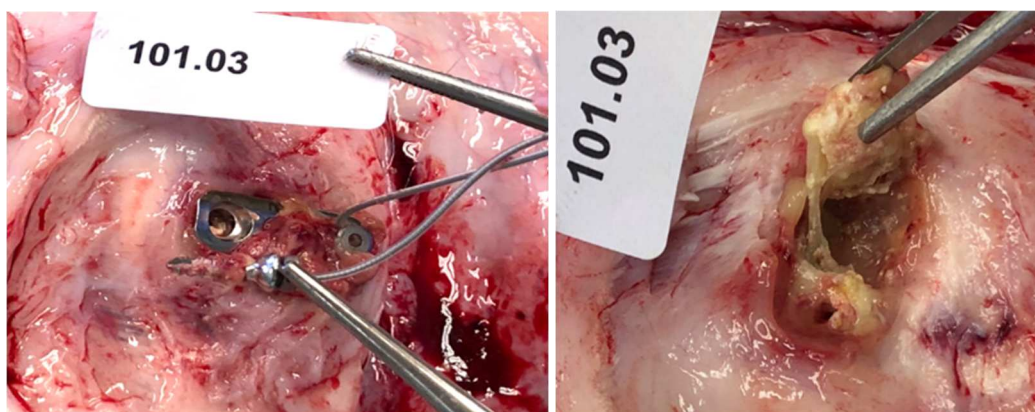


Abbildung 4.3: Tier 101.03, li: lokale Infektion der Tibia mit implantierter Platte und Schraube; re: hgr. osteolytischer Knochenblock nach Entfernung der Platte in der Tibia

#### 4.8.3 Makroskopische Beurteilung Pilotphase-3

Die Wunden beider Tiere waren trocken und ohne besonderen Befund. Nach der Eröffnung der Haut und Freipräparierung der Tibia wurde derber Eiter rund um die Stahlplatten sichtbar (siehe Abb. 4.5). Ein markanter, abgekapselter Abszess, rötlich gefärbt und von gut vaskularisiertem Gewebe umgeben, wurde als Probe entnommen (101.06). Bei Tier 101.05 wurde derber körniger Eiter auch in tieferen Gewebsschichten beobachtet. Es wurde festgestellt, dass der Eiter und die hochgradige Vaskularisierung weiter fortgeschritten waren und nicht zum Zeitfenster der gesetzten Infektion passten. Entlang der Überträgerkabel befand sich ebenfalls derber Eiter. Die Überträger Clips saßen fest auf den Schrauben. Bei einem Überträgerkabel (101.05) wurde ein Knick im Kabel bemerkt, die Messung mit dem Multimeter (Widerstand 93.6  $\Omega$ ) stellte jedoch die

volle Funktionsfähigkeit des Überträgers fest. Der Überträger des Tieres 101.06 hatte einen Widerstand von 94.6  $\Omega$ . Auf den festsitzenden Kortikalisschrauben befand sich derber Eiter. Lediglich die kaudale Kortikalisschraube (101.06) war geringgradig lose, da das Schraubenloch bereits während der OP geweitet wurde. Nach der Entfernung der Schrauben wurde derber Eiter ebenfalls in den Schraubenlöchern und den Knochendefekten beobachtet. Das Knochengewebe war hochgradig nekrotisch.

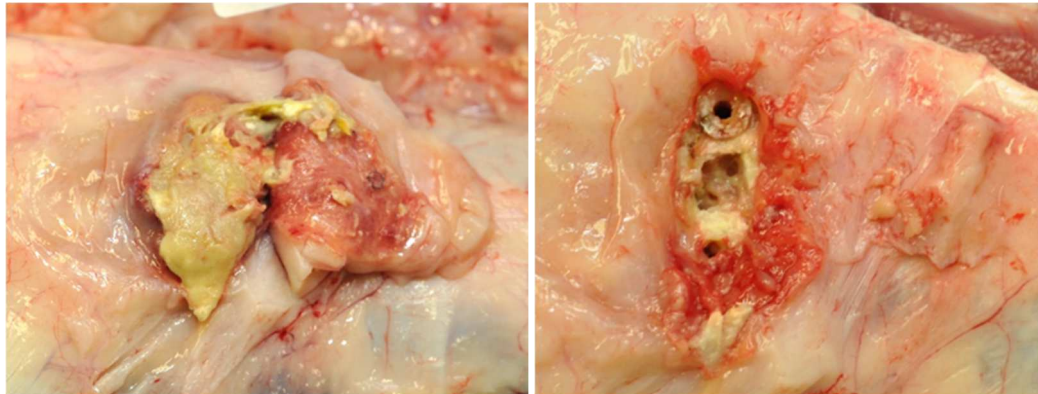


Abbildung 4.4: Tier 101.05, li: abgekapselter Abszess oberhalb der implantieren Platte an der Tibia; re: hgr. Vaskularisation & hgr. osteolytischer Knochenloch nach Entfernung des Knochenblocks der Tibia

## 4.9 Bakterien Ergebnisse

Die Ergebnisse der *S. aureus* Bakterienkonzentrationen aller Pilotphasen können der folgenden Tabelle entnommen werden

Pilot-Phase	Tier	Initiales Innokulum	Tibia				Gelenk-Flüssigkeit (KbE/ml)	Femur (BISS)			
			Knochen (KbE/g)	Weichgewebe (KbE/g)	Platte / Schrauben (KbE/ml)	Transducer (KbE/ml)		Knochen (KbE/g)	Weichgewebe (KbE/g)	Platte / Schrauben (KbE/ml)	Transducer (KbE/ml)
1	101.01	2.00E+05	5,56E+03	2,67E+04	1,63E+04	4,00E+04	-	4,44E+04	3,79E+04	1,73E+03	3,07E+04
	101.02	2.00E+05	6,06E+03	2,67E+04	1,08E+04	2,67E+04	1.38E+03	6,67E+04	8,49E+02	8,53E+03	2,13E+04
2	101.03	1.00E+04	3,92E+05	6,20E+03	5,20E+05	6,93E+04	-	-	-	-	-
	101.04	1.00E+04	5,68E+06	6,61E+03	3,73E+05	1,71E+04	-	-	-	-	-
3	101.05	1.00E+04	1,63E+07	3,66E+03	8,80E+04	1,71E+05	-	-	-	-	-
	101.06	1.00E+04	8,58E+06	5,77E+04	1,61E+05	5,47E+04	-	-	-	-	-

Tabelle 4.4: bakterielle Auswertung der Proben

Die mikrobiologische Auswertung wurde bei allen Pilotphasen durchgeführt.

Zusammenfassend waren in allen Proben Bakterien nachzuweisen (Knochengewebe, Weichteilgewebe sowie allen eingesetzten Implantate).

## 4.10 Auswertung der Histologie

Die semiquantitative histologische Auswertung kann dem Anhang entnommen werden (Tab. 8.17 bis 8.22). Alle Lymphknoten konnten gut entnommen und aufbereitet werden. Die inguinalen und poplitealen Lymphknoten von der behandelten Seite waren bei allen Schafen geringgradig vergrößert, von gelb-rötlicher Farbe und von einer derben

Konsistenz. Die Lymphknoten der nicht- behandelten Seite schienen weder vergrößert noch verändert.

#### 4.10.1 Histologische Auswertung Pilotphase-1

##### *Lymphknoten*

Die poplitealen Lymphknoten wurden jeweils von der behandelten Gliedmasse entnommen. Die inguinalen Lymphknoten wurden beidseits von beiden Tieren entnommen.

Die Ergebnisse der histologischen Auswertung kann der Anhang Tab. 8.17 entnommen werden. Das Bewertungssystem richtet sich nach der der Tab. 8.4 im Anhang.

Tier- nummer	Seite	Strukturveränderung		Entzündungsreaktion		Anwesenheit von Bakterien	
		Lnn. poplitei	Lnn. inguinales	Lnn. poplitei	Lnn. inguinales	Lnn. poplitei	Lnn. Inguinales
101.01	behandelt (links)	0	1	0	1	1	0
	nicht behandelt (rechts)	NA		NA	2	NA	
101.02	behandelt (rechts)	2		2	1	0	
	nicht behandelt (links)	NA		NA		NA	

Tabelle 4.5: Auswertungsergebnisse der poplitealen und inguinalen Lymphknoten beidseitig, Pilotphase-1; N/A (not applicable; Legende siehe Anhang Tab. 8.20))

- Zusammenfassend wurde in den inguinalen und poplitealen Lymphknoten eine leichte Strukturveränderung und Entzündungsreaktion (Abb. 4.6), ohne das Vorkommen von Bakterien beobachtet. Das zeigte sich an einer geringgradigen Aktivierung der Sekundärfollikel und der vaskulären Reaktion des Kortex, sichtbar geworden durch eine Dilatation der Lymphgefäße.
- Der popliteale Lymphknoten von 101.01 wies keine Strukturveränderungen sowie keine Entzündungsreaktionen oder das Vorkommen von Bakterien auf.
- Der rechte popliteale Lymphknoten von Tier 101.02 wies moderate Strukturveränderungen mit Sinus Histiozytosen sowie eine moderate Entzündungsreaktion auf. Es fand sich dabei eine Mischflora von grampositiven Bakterien einer unbekannten Quelle.



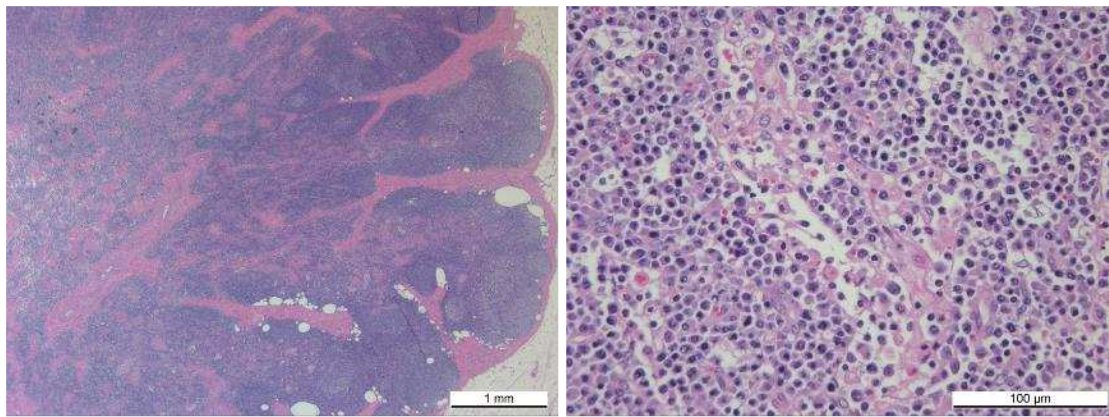


Abbildung 4.5: li: Übersicht inguinaler Lnn. (HE-Färbung); Re: Leichte Strukturveränderungen und wenig Entzündungszellen (HE-Färbung)

- Die inguinalen Lnn. zeigten eine leichte Strukturveränderung mit einer leicht follikulären Depletion und keinen Nachweis von Bakterien.
- Die 3/4 inguinalen Lnn. (101.01 li; 101.02 beidseits) zeigten eine leichte Entzündungsreaktion, markiert durch wenige Granulozyten in Begleitung von eosinophilen Granulozyten (wahrscheinlich parasitär verursacht).
- Bei 1/4 Lymphknoten (101.02) wurde eine moderate Entzündungsreaktion mit einer Anhäufung von neutrophilen Granulozyten in Begleitung von eosinophilen Granulozyten (die wiederum auf eine parasitäre Infektion hindeuteten) nachgewiesen.

### *Knochen*

Zusammenfassend wurden in der ersten Phase überwiegend akute entzündliche Gewebereaktionen mittleren bis hohen Grades beobachtet, charakterisiert mit einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten ohne intertrabekulären Abszess. Die beginnenden chronischen Entzündungszeichen waren minimal bis mittelgradig und durch eine Infiltration von Lymphozyten und Plasmazellen markiert. Außerdem wurde in dieser Phase ein Aufbau von unreifem Granulationsgewebe festgestellt. Es fanden sich ausschließlich multiple Nekroseherde mit einzelnen Sequestern. Des Weiteren wurde eine mittelgradige Anzahl von Bakterien dargestellt, die multifokal auftraten.

In den Femur Schraubenlöchern beider Tiere (101.01, 101.02) wurde eine mittelgradig bis hochgradig Infiltration von neutrophilen Granulozyten, ohne intramedullären Abszess festgestellt mit einer geringgradig bis mittelgradige chronische Entzündung mit unreifem Granulationsgewebe (Abb. 4.7). Die Knochennekrose konnte durch multiple Nekroseherde mit einzelnen Sequestern und einer geringgradigen Osteolyse



nachgewiesen werden. Eine mittelgradige Anzahl von grampositiven Bakterien (multifokal) wurde beobachtet.

Akute Entzündungsanzeichen waren in den Schraubenlöchern der Tibia bei einem Tier (101.01) durch eine mittelgradigen bis hochgradige Infiltration von neutrophilen Granulozyten mit intertrabekulärem Abszess vorzufinden. Als chronische Entzündungszeichen waren Fibroblasten mit unreifem Granulationsgewebe nachweisbar. Multiple Nekroseherde und Sequester (Abb. 4.7) und eine mittelgradige Anzahl von multifokal auftretenden Bakterien wurden ebenfalls beobachtet.

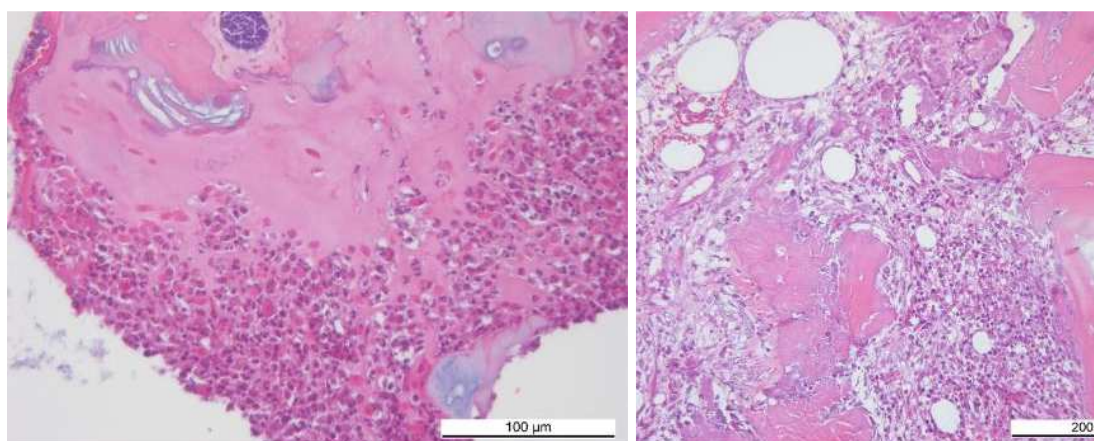


Abbildung 4.6: li: mgr.- hgr. akute entzündliche Komponente, ggr.- mgr. Bakterien, beginnende leicht bis moderate chronische Entzündungszeichen (HE-Färbung); re: Osteolyse, Sequester und Nekrose (HE-Färbung)

In den Schraubenlöchern der Tibia (101.02) war lediglich eine mittel-hochgradig Infiltration von neutrophilen Granulozyten ohne intertrabekulärem Abszess und nur eine gering-mittelgradigen chronische Entzündung ohne signifikantes Granulationsgewebe (fibrotische Komponenten) zu beobachten. Es waren ebenfalls multiple Nekroseherde, jedoch mit einzelnen Sequestern und einer geringgradigen Osteolyse feststellbar. Es konnte eine geringgradige Anzahl fokal auftretender Bakterien (einzeln auftretend oder weniger als 2 Kolonien) nachgewiesen werden.

Die Knochendefekte der Tibia beider Tiere waren durch gering - mittelgradig. (Tier 101.01) bzw. mittelgradig-hochgradig (Tier 101.02) Infiltration von neutrophilen Granulozyten von einem intratrabekulärem Abszess durchzogen. Die chronischen Entzündungszeichen waren gering-mittelgradig (Tier 101.01) beziehungsweise mittelgradige (Tier 101.02) ohne signifikantes beziehungsweise mit nur unreifem Granulationsgewebe und fibrotischen Komponenten nachzuweisen. Es waren multiple Nekroseherde mit einzelnen Sequestern und einer deutlich hervortretenden Osteolyse feststellbar. Die Bakterien waren gering-mittelgradig und multifokal auftretend sichtbar.

Der Knochenblock von Tier 101.01 bestand aus nekrotischem Knochengewebe, an dem eine geringe Anzahl an Bakterienkolonien anhaftete. Bei Tier 101.02 waren die Veränderungen ähnlich der des Tibiadefektes. Die akuten Entzündungsreaktionen waren deutlicher ausgeprägt als die chronischen.

#### 4.10.2 Histologische Auswertung Pilotphase-2

##### *Lymphknoten*

Es wurden jeweils die ganzen inguinalen und poplitealen Lymphknoten der operierten und nicht operierten Seite entnommen.

Zusammenfassend wurden in den poplitealen sowie inguinalen Lymphknoten überwiegend leichte Strukturveränderungen beobachtet. Es wurden keine bis wenige Entzündungszellen in den poplitealen und inguinalen Lymphknoten nachgewiesen. In den poplitealen Lymphknoten wurde kein Vorkommen von Bakterien beobachtet, in den inguinalen Lymphknoten wurde keine bis eine geringe Menge an Bakterien festgestellt. Die histologischen Ergebnisse können der folgenden Tab. 4.6 entnommen werden.

Tiernummer	Seite	Strukturveränderung		Entzündungsreaktion		Anwesenheit von Bakterien	
		Lnn. poplitei	Lnn. inguinales	Lnn. poplitei	Lnn. inguinales	Lnn. poplitei	Lnn. inguinales
101.03	behandelt (links)	2	2	2	2	0	0
	nicht behandelt (rechts)	1	1	1	1		1
101.04	behandelt (links)			0			
	nicht behandelt (rechts)	0	0		0		

Tabelle 4.6: Auswertungsergebnisse der poplitealen und inguinalen Lymphknoten beidseitig, Pilotphase-2 (Legende siehe Anhang Tab. 8.20)

- In 2/4 der poplitealen Lnn. wurden leichte Strukturveränderungen anhand einer geringgradigen Anzahl von Plasmazellen und Makrophagen sowie einer geringgradigen Anzahl von neutrophilen Granulozyten festgestellt.
- In einem poplitealen sowie inguinalen Lnn. (101.03) wurden moderate Strukturveränderungen gesichtet.
- 1/4 der poplitealen Lnn. (101.03) wies eine geringe Entzündungsreaktion mit einer geringgradigen Anzahl von Plasmazellen und Makrophagen, sowie eine geringgradigen Anzahl von neutrophilen Granulozyten, auf.

- In einem poplitealen Lymphknoten (101.03) wurde eine moderate Anzahl an Entzündungsreaktionen, anhand einer hohen Anzahl von Plasmazellen mit einer geringgradigen Anzahl von Histiozyten nachgewiesen.
- 2/4 der inguinalen Lnn. zeigten eine leichte Strukturveränderung und eine leichte Entzündungsreaktion, mit einer geringgradigen Anzahl von Plasmazellen und Makrophagen.
- In 1/4 (101.03) der inguinalen Lnn. wurde eine moderate Entzündungsreaktion mit einer hochgradigen Anzahl von Plasmazellen nachgewiesen; dabei wurde eine geringgradige Anzahl von neutrophilen Granulozyten aufgezeigt (Abb. 4.8). Des Weiteren wurden große Herde von schaumigen Makrophagen (epitheloid-ähnlich), sowie Riesenzellen vom Typ Langhans beobachtet. Dieser Befund wurde aber nicht als projektbezogen interpretiert.
- In allen untersuchten poplitealen Lymphknoten wurden keine Bakterien beobachtet.
- In 3/4 der inguinalen Lnn. wurde eine geringe Menge von Grampositiven, kokkoiden Bakterien, in Form von 1-2 kleiner Herde nachgewiesen. Dabei wurden einzelne Herde von freien Bakterien beobachtet. Zahlreiche bakterienähnliche Strukturen wurden intrazellulär (durch Phagozytose) festgestellt (Abb. 4.8).

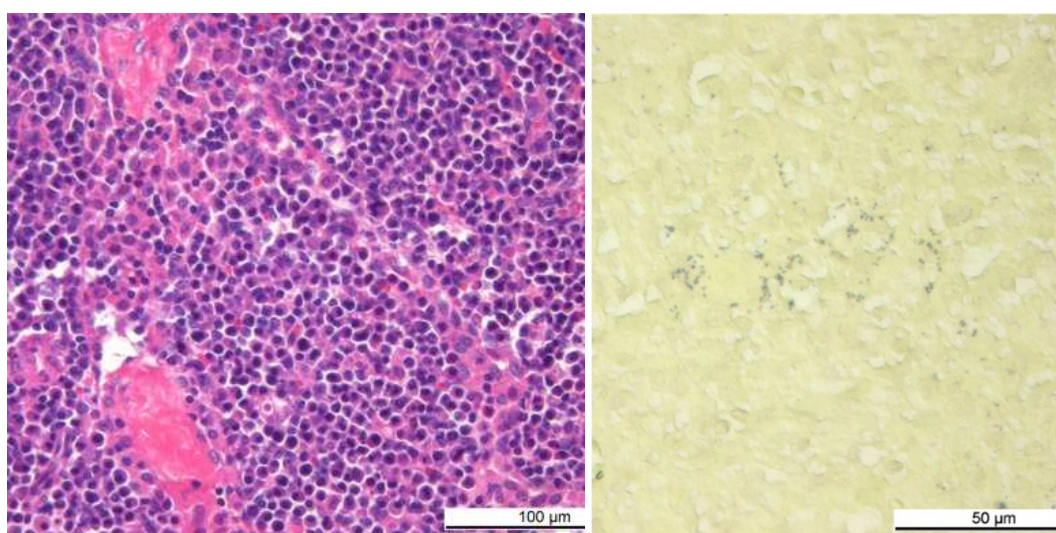


Abbildung 4.7 inguinaler Lnn. li: leichte Strukturveränderungen und wenig Entzündungszellen, viele Plasmazellen (HE-Färbung); re: ggr. kokkoide gram positive Bakterien und zahlreiche intrazelluläre Bakterienähnliche Strukturen durch Phagozytose (Brown-Brenn-Färbung)

---

### *Knochen*

In den Schraubenlöchern der Tibia und des Defektes des Tieres 101.03 aus der Pilotphase-2 wurden akute Entzündungszeichen mit mittel-bis hochgradig Infiltration von neutrophilen Granulozyten und intramedullären Abszessen beobachtet. Die mittel-bis hochgradig chronische Entzündungsreaktion war durch signifikantes Granulationsgewebe sowie fibrotische Komponenten gut sichtbar. Multiple Nekroseherde waren vorhanden in Begleitung von Sequestern, dabei wurden gering bis mittelgradig multifokale Bakterien aufgefunden. Im Knochenblock waren überwiegend die akuten Entzündungsanzeichen mit multiplen Abszessen, Nekrose und Osteolyse sichtbar (keine fibrotischen Komponenten, kein Granulationsgewebe).

Bei einem Tier (101.04) wurden in den Schraubenlöchern der Tibia akute Entzündungsanzeichen beobachtet, anhand der gering-bis mittelgradig Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Auftreten eines intertrabekulären Abszess, dabei wurden multiple Nekroseherde mit Sequestern nachgewiesen. Der Knochendefekt zeigte eine gering- bis mittelgradig Infiltration von neutrophilen Granulozyten ohne intertrabekulären Abszess und nur einzelne Nekroseherde ohne Sequesterformationen auf. Sowohl in den Schraubenlöchern als auch im Knochendefekt konnten mittelgradige bis hochgradige chronische Entzündungszeichen mit signifikantem Granulationsgewebe, fibrotischen Komponenten sowie eine geringgradige Anzahl von fokal auftretenden Bakterien nachgewiesen werden. Die Bakterien befanden sich meist nur an der Oberfläche (minimal), bzw. vorwiegend am Knochenblock angeheftet. Der Knochenblock wies nur wenige Herde mit akuten Entzündungskomponenten (Abszesse und geringgradig neutrophile Granulozyten) und nur wenig Knochennekrose (keine fibrotischen Komponenten) auf. Eine mittelgradige Ansammlung von multifokal auftretenden Bakterienherden wurde ebenfalls festgestellt.

### **4.10.3 Histologische Auswertung Pilotphase-3**

#### *Lymphknoten*

Es wurden von beiden Tieren beide poplitealen Lymphknoten und inguinalen Lymphknoten entnommen und histologisch untersucht.

Die histologischen Ergebnisse Auswertung sind in Tab. 4.7 ersichtlich.

Zusammenfassend wurde sowohl in den poplitealen als auch den inguinalen Lymphknoten überwiegend leichte Strukturveränderungen beobachtet und keine

Bakterien gefunden. Keine bis leichte Entzündungsreaktionen wurden in den poplitealen Lymphknoten gefunden. In den inguinalen Lymphknoten wurden überwiegend leichte Entzündungsreaktionen beobachtet.

Tier-nummer	Seite	Strukturveränderung		Entzündungsreaktion		Anwesenheit von Bakterien	
		Lnn. poplitei	Lnn. inguinales	Lnn. poplitei	Lnn. inguinales	Lnn. poplitei	Lnn. Inguinales
101.05	behandelt (links)	1	1	1	1	0	0
	nicht behandelt (rechts)	0	0	0			
101.06	behandelt (links)	1	1	1	0	0	0
	nicht behandelt (rechts)			0			

Tabelle 4.7: Auswertungsergebnisse der poplitealen und inguinalen Lymphknoten beidseitig, Pilotphase-3 (Legende siehe Anhang Tab. 8.20)

- 3/4 der poplitealen Lnn. (außer 101.05- nicht behandelte Seite) wiesen leichte Strukturveränderungen auf.
- Bei den Strukturveränderungen wurde eine leicht erhöhte Anzahl an Sinus-Histiozyten im rechten inguinalen Lymphknoten im Tier 101.06 beobachtet.
- In den poplitealen Lnn. beider Tiere (operierte Seite) wurden leichte Entzündungsreaktionen beobachtet, mit einer leicht erhöhten Anzahl von Plasmazellen.
- Bei 3/4 der inguinalen Lnn. (außer 101.05 -nicht behandelt Seite) wurden leichte Strukturveränderungen und leichte Entzündungsreaktionen beobachtet. Die Veränderungen wurden durch eine erhöhte Anzahl von schaumigen Makrophagen (aktivierte Makrophagen) gekennzeichnet. Darüber hinaus wurde bei Tier 101.05 eine geringgradige Anzahl von neutrophilen Granulozyten (wahrscheinlich parasitär bedingt) in beiden inguinalen Lymphknoten gefunden. Eine erhöhte Anzahl von Plasmazellen wurde bei dem linken inguinalen Lymphknoten im Tier 101.06 gesehen.

### Knochen

Makroskopisch wurde beim Tier 101.06 eine Abszessbildung von 2 x2 x 1.5 cm Größe mit einer dicken Kapsel nachgewiesen. Der Inhalt war gelblich und krümelig (ein organisierter Abszess in Auflösung).

---

Histologisch fand sich in der Abszess Kapsel ein breites Band mit gereiftem kollagenreichem Granulationsgewebe, das multifokal vorwiegend perivaskulär mit Lymphozyten und Plasmazellen infiltriert war. Die innere Seite der Abszess Kapsel war deutlich vaskularisiert und mit wenigen neutrophilen Granulozyten belegt. Durch die Brown-Brenn Färbung konnten multifokale Herde von kokkoidalen Bakterien nachgewiesen werden.

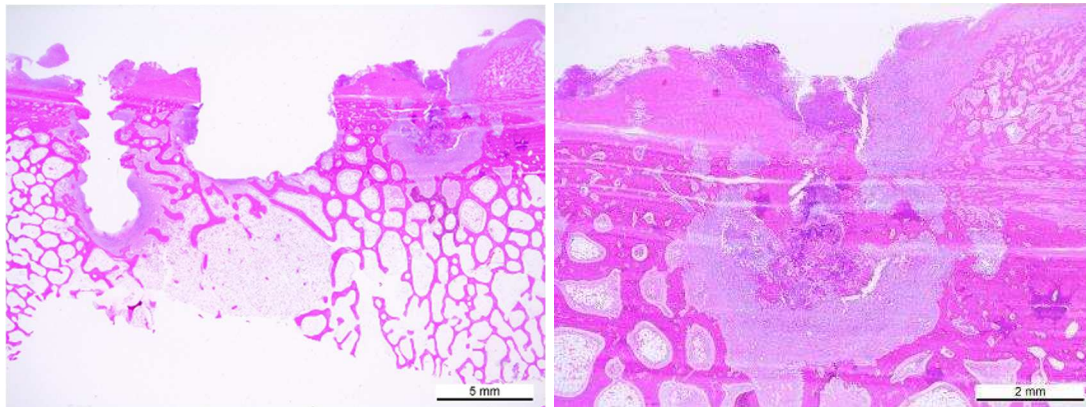


Abbildung 4.8: li: Übersicht Knochen mit kollabiertem Schraubenloch, Nekrose, Osteolyse & fibrotisches Granulationsgewebe (HE-Färbung); re: kollabiertes Schraubenloch, Abszessbildung, Bakterien im kollabierten Schraubenloch (HE-Färbung)

Die Veränderungen in der letzten Pilotphase waren vergleichbar mit der zweiten Pilotphase, jedoch mit deutlicherer Knochenlyse, Abszessbildung und Nekrose. Die Anzahl der histologisch sichtbaren Bakterien war höher im Vergleich zur 2. Gruppe.

Die Schraubenlöcher und Defekte beider Tiere (101.05 und 101.06) wiesen mittel- bis hochgradig Infiltrationen von neutrophilen Granulozyten mit intramedullären Abszessen auf. Es zeigte sich ein mittlerer bis hoher Grad an chronischen Entzündungszeichen in allen Defekten und Schraubenlöchern (101.05, 101.06), mit einem hohen Anteil an Granulationsgewebe und Fibrose und von multiplen Nekroseherden und Sequestern durchzogen. Es zeigte sich zudem eine hochgradige Anzahl von multifokal bis diffus auftretenden Bakterien im Knochendefekt sowie in einem Schraubenloch bei Tier 101.05. Auffällig war zudem, dass die Schraubenlöcher der Tibia (101.06) oberflächlich vollständig kollabiert waren. Es wurden multiple Mikrofrakturen mit einer Reaktion in einem der kollabierten Schraubenlöcher (101.05) erkennbar. Außer an der Oberfläche, waren in diesem Schraubenloch des Tieres 101.05 keine Bakterien sichtbar.



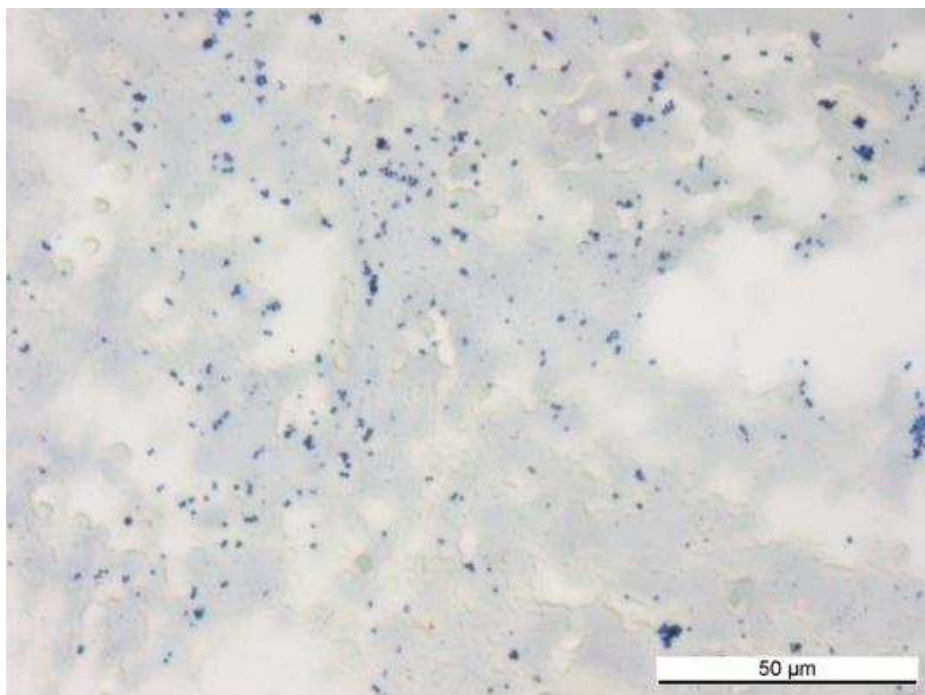


Abbildung 4.9: hgr. Anzahl von gram -positiven kokkoidalen Bakterien (Brown-Brenn-Färbung)

Nahezu die Hälfte des Knochenblocks des Tieres 101.06 bestand aus Nekrose mit Abszessen und war mit multiplen Bakterien infiltriert. Das Knochenblock von Tier 101.05 war massiv zerrissen, mit einer hohen Anzahl von Bakterienkolonien. Es wurden keine chronischen Entzündungszellen in oder an dem Knochenblock beobachtet.

## 4.11 Zusammenfassung Resultate und resultierende Entscheidung

Nach jeder Pilotphase wurden alle erlangten Ergebnisse ausgewertet und von den Projektpartnern gemeinsam besprochen. So wurde somit gewährleistet, dass Fehler vermieden und die Pilotphasen stetig optimiert werden konnten.

### 4.11.1 Fazit Pilotphase-1

In der Inlife Phase kam es durch den BSL-2 Stall zu Komplikationen. Da der Boden zwar gut zu reinigen, doch für die Klauen der Schafe zu rutschig war, kam es am ersten Tag post OP zu einer Verletzung bei einem Schaf (101.02). Es wurde umgehend eine rutschfeste Gummimatte in den BSL-2 Stall gelegt. Zur Vermeidung dieser Komplikation wurde beschlossen standardmässig eine solche rutschfeste Unterlage in den BSL-2 zu legen. Diese sollte nach jeder Pilotphase nach BSL-2 Standards entsorgt und ausgewechselt werden.

Da die Tiere durch die gesetzte Knocheninfektion sehr schmerzhaft waren, wurde entschieden, zusätzlich zu der täglichen Carprofen Medikation noch Buprenorphin drei Mal täglich im Abstand von je acht Stunden zu der Schmerzmedikation hinzuzufügen. In

---

den folgenden Studien sollte möglichst auf die dreifache Buprenorphin Dosis (0,03 mg/kg KGW) verzichtet werden, da der Schmerz zwar dadurch deutlich reduziert wurde, aber die Tiere ebenfalls stark sediert waren (Apathie) und der Appetit deutlich reduziert wurde. Eine Schmerzausschaltung mit Paracetamol zeigte bei der gesetzten Infektion keinerlei Wirkung, folglich sollte in Zukunft kein Einsatz mit Paracetamol mehr erfolgen.

Das makroskopische Bild, dass sich bei der Eröffnung der operierten Gliedmaße zeigte, stellte sich als gravierend dar. Die Bakterien um die BISS Schraube kamen in Kontakt mit dem Überträgerkabel und wanderten daran entlang bis zum Erreichen des Überträgers, wo sie das umliegende Gewebe ebenfalls infizierten. Das ist ein bekanntes Problem bei Fremdmaterialien und einer Infektion. Man entschied sich das gewählte Bakterieninokulum bei Infektion zu reduzieren und ein kleineres Flüssigkeitsvolumen des Inokulums zu wählen, damit die Bakterien im Knochenblock blieben. Nach Einsetzen der Schrauben während der OP, trat bereits Inokulum aus dem Bohrloch des Femurs bzw. aus dem Tibiadeфекt.

Die Ergebnisse der bakteriologischen Quantifizierung zeigten, dass das Bakterieninokulum zur Infektion erniedrigt werden sollte um eher ein chronisches Infektionsmodell zu haben. Eine hochgradige Bakterienanzahl (Tibiaknochen:  $5,81 \times 10^3$  CFU/g, Weichteilgewebe:  $2,26 \times 10^4$  CFU/g, Tibiaplatte und Schrauben:  $1,35 \times 10^4$  CFU/ml, Tibia Überträger:  $3,34 \times 10^4$  CFU/ml) wurde auf allen entnommenen Proben nachgewiesen (v.a. die hohe Konzentration von Bakterien auf dem Überträger zeigte das). Daraufhin wurde entschieden in der folgenden Pilotphase die Konzentration von  $2 \times 10^5$  auf  $1 \times 10^4$  und das Volumen von 100 µl auf 20 µl des Inokulums herabzusetzen. Da das Schaf physiologisch im Femur eine sehr weit reichende Gelenkshöhle hat, bestand die Problematik während der OP die BISS Schraube entweder zu nah an die Gelenkshöhle oder zu nah an die Markhöhle zu setzen. Beide Optionen beinhalteten das Risiko einer Sepsis. Da in der Pilotphase-1 nachweislich beide Tiere eine Gelenkshöhleninfektion im Kniegelenk entwickelten, wurde entschieden auf die Femur Komponente zu verzichten und nur eine lokale Infektion in der Tibia zu provozieren.

Es wurde bemerkt, dass anders als bei anderen Studien, das Wechseln der OP Gliedmaße nach jeder OP keinerlei Einfluss auf die gesetzte Infektion hat. Folglich wurde beschlossen nur noch die linke Gliedmaße zu operieren.

Nach Erlangen aller Ergebnisse wurde in einem Treffen mit allen beteiligten Personen beschlossen, von der ursprünglichen Versuchsanordnung abzuweichen und mit einer weiteren Pilotphase mit zwei Schafen fortzufahren. Die Pilotphase-2 wurde für drei



Wochen Inlife Phase angesetzt und sollte alle oben genannten Änderungen mit einbeziehen. Das Veterinäramt Zürich wurde über die Abänderung informiert und die Abänderung der Versuchsanordnung genehmigt.

#### **4.11.2 Fazit Pilotphase-2**

In der Inlife Phase der Pilotphase-2 kam es im Gegensatz zu der vorherigen Pilotphase zu keinen stallbedingten Verletzungen und Komplikationen.

Die Tiere waren an den Tagen 3.-14. post OP vermehrt lahm und schmerzhaft. Eine Schmerzreduktion konnte nachweislich durch die Buprenorphin Gabe in einfacher Dosis (0,01 mg/kg KGW) alle 8 Stunden in dieser Zeit zufriedenstellend reduziert werden. Ein Auslassen von Carprofen sollte in der folgenden Pilotphase nicht mehr erfolgen, da die Schafe ohne die tägliche Carprofen Gabe eine Erhöhung der Entzündungszeichen an der operierten Gliedmaße zeigten. Es wurde jedoch beschlossen, dass nach Abklingen der akuten Entzündungsphase (hier ab Tag 14 post OP) eine Medikation mit nur der halben Dosis Carprofen (2 mg/kg KGW) fortgeführt werden sollte.

Der Osteomyelitis Bewertungsbogen sollte noch um den Punkt „Sensibilität der OP Wunde“ ergänzt werden. Zusammenfassend wurde dieser täglich zusätzlich bewertet. Zur einheitlichen Validierung sollte auch hier ein Punktesystem (Skala 0-5) erfolgen. Der Bewertungsbogen wurde nach der Feststellung daraufhin um diesen Punkt ergänzt.

Das Anlegen und Tragen der Feldspule wurde von beiden Tieren gut toleriert, weshalb beschlossen wurde in der darauffolgenden Pilotphase die PEMF Therapie einzusetzen.

Sowohl makroskopisch als auch histologisch wurde bei beiden Tieren eine akute Infektion diagnostiziert. Makroskopisch war noch auffällig, dass beide gesetzten Kortikalisschrauben locker im Knochen steckten und die gesetzte Infektion lokal an der Tibia (vgl. makroskopische Ergebnisse der Pilotphase-2) verblieb, wonach sowohl die Konzentration ( $1 \times 10^4$  KbE), als auch das Volumen (20 µl) des Inokulums für zufriedenstellend befunden wurde und mit diesen fortgefahen werden sollte.

Weiterhin wurde zusammenfassend festgehalten, dass durch das Weglassen der Femurkomponenten eine Gelenksinfektion abgewendet verhindert werden konnte.

In einer weiteren Pilotphase mit zwei Tieren, sollte nun die PEMF Therapie eingesetzt werden.

---

### 4.11.3 Fazit Pilotphase-3

Zusammenfassend waren beide Tiere in dieser Pilotphase klinisch besser als in den Pilotphasen zuvor. In der Inlife Phase wurde eine geringgradige Lahmheit und ein geringgradiges Schmerzverhalten nur während der ersten 3-10 Tage post OP beobachtet. Sie wurde mit Carprofen und Buprenorphin ausreichend schmerztherapiert. Danach waren beide Schafe durchgehend lahmheitsfrei. In den folgenden Tagen wurde die Carprofen Medikation auf die halbe Dosis (2 mg/kg KGW, einmal täglich) herabgesetzt. Die PEMF Therapie wurde gut toleriert und durchgängig angewendet.

Makroskopisch wie auch histologisch wurde eine chronische Infektion diagnostiziert. Das Knochengewebe in dem Tibiadeфекt und den Schraubenlöchern war nachweislich härter als in der Pilotphase -2. Gelber Eiter war nachweisbar, jedoch abgekapselt und von einer derben bis rahmig -dickflüssigen Konsistenz. An der operierten und PEMF behandelten Gliedmaße war bei beiden Tieren nachweislich eine gute Angiogenese sichtbar.

Die bakteriologische Quantifizierung zeigte abermals eine hohe Konzentration an Bakterien.

Da die Ergebnisse zeigten, dass die PEMF keinen deutlich positiven Effekt in Richtung Eindämmung der Infektion zeigte, sondern vielmehr dazu beitrug, in kürzester Zeit eine chronische Infektion aus dem injizierten Inokulum zu entwickeln, wurde nach einer weiteren Besprechung mit den Projektpartnern beschlossen, die Studie abubrechen und nicht fortzuführen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Zielstellung und Erkenntnisse

#### 5.1.1 Tiermodell

In der vorliegenden präliminären Studie sind die Entwicklung und Optimierung sowie letzten Endes die Etablierung eines Tiermodells für eine akute lokale Osteomyelitis im Schaf gelungen.

Das Tiermodell diene als Grundlage für Erkenntnisse zur Wirksamkeit der PEMF bei einer lokalen akuten Osteomyelitis.

#### *Tierart*

Zusammenfassend bestätigte sich, dass das Schaf den geforderten Anforderungen an ein Osteomyelitis Tiermodell entsprochen hat. Nach der Akklimatisierung haben die Studienschafe den BSL-2 Stall gut angenommen und sich problemlos eingewöhnt. Die Gewöhnung an die Coils verlief ebenfalls ohne Probleme und ohne jeweilige Gefährdung von Mensch und Tier.

Es bestätigte sich, dass die Schafe genügsam sind und eine hohe Toleranzschwelle besitzen. So mussten während den Coil Treatments in der Pilotphase-2 und-3 (zwei Mal täglich à 90 Min) die Tiere nicht durchgehend überwacht werden. Die Aufhängung des Coils mithilfe eines Gurtes sicherte die korrekte Positionierung des Coils am Hinterbein. Die Hauptfütterungszeiten auf den Zeitpunkt des Treatments zu legen, führte mitunter zu einer Ablenkung aber auch einer positiven Konditionierung. Post OP konnte die ROI durch einen einzelnen Tierarzt gut evaluiert werden. Eine Sedierung war auch während der Röntgenaufnahmen nicht notwendig. Das beschriebene Umsetzen und Lagern des Schafes, konnte durch zwei Tierärzte schnell und erfolgreich und somit stressfrei für das Versuchstier erfolgen.

Abweisendes Verhalten gegenüber den Coils führte im Verlauf der Studie zu keinem Zeitpunkt zu Herausforderungen. Die Schafe versuchten nicht, sich aus den Coils herauszuwinden, wie es z. B. bei Meerschweinchen und Kaninchen sehr wahrscheinlich gewesen wäre. Auch ein Annagen des Coils bzw. der Kabel (wie bei Ziege oder Hund zu erwarten) konnte nicht festgestellt werden.

---

Zusammenfassend war die Auswahl des Schafes als Versuchstier für die vorliegende Studie vor den Gesichtspunkten der Verträglichkeit und Zumutbarkeit für Tier und Mensch aus vielen Gesichtspunkten richtig.

Es bestätigte sich zudem, dass beim Schaf aufgrund seiner dem adulten Menschen ähnlichen Knochenstruktur, dem robusten Immunsystem sowie der biomechanischen Belastungssituation als Versuchstier in einer Osteomyelitis Studie gut auswertbare Ergebnisse erzielt werden konnten (50, 88).

In der vorliegenden Studie zeigte sich zudem in allen Pilotphasen eine hohe Homogenität bezüglich des Krankheitsbildes und Heilungsverlaufes der Versuchstiere, was eine Standardisierung des Tiermodells begünstigt. Zudem blieb in allen Pilotphasen eine systemische Verbreitung der Infektion bzw. eine Sepsis trotz der hohen Pathogenität des Keimes aus.

### *Biosafety und Abläufe*

Bei der Planung des BSL-2 Stalles war es erforderlich, dass nicht nur singulär nach den Vorgaben der Biosicherheit geplant wurde.

Die Zusammenarbeit von den behandelnden Tierärzten und den Tierpflegern unter den Vorgaben des Veterinäramtes waren entscheidend, um einen sowohl regelkonformen als auch artgerechten Stall für Schafe unter BSL-2 Maßgaben zu planen und umzusetzen. Dabei wurde zwischen den Pilotphasen der Stall immer weiter angepasst und optimiert. In BSL-2 Versuchen mit Mäusen oder Ratten gelten die Durchführungen bereits als standardisiert (50, 85, 91). Käfige für Nagetiere sind zudem leicht zu reinigen und die jeweilige Einstreu ist deutlich staubfrei und entsprechend rein zu beschaffen. Alternativ sind beispielsweise auch Zwinger für Versuchshund ebenfalls sehr einfach zu reinigen, da diese nicht eingestreut werden (92).

Bei Schafen stellt sich die Situation dar, dass die Ställe für die Tiere entsprechend größer sind, dementsprechend deutlich mehr Material wie Heu und Stroh benötigt wird. Das tägliche Misten der Ställe, die Fütterungen und klinischen Untersuchungen wurden unter BSL-2 Auflagen mit Schutzkleidung durchgeführt. Zudem wurden im Verlauf der Pilotstudien weitere Anforderungen der Tiere an die Stallung offenkundig, die zusätzliche Anpassungen der Baulichkeiten und Abläufe erforderlich machten, wie z. B. das Auslegen und regelmäßige Austauschen von trittsicheren Gummimatten.

Die Haltungsansprüche von Schafen in Kombination mit den BSL-2 Vorgaben bedeuteten demnach zwar einen erheblich größeren Aufwand als es bei Nagetieren in

Käfigen oder bei Hunden in Zwingern ohne Einstreu der Fall gewesen wäre. Dennoch überwiegen die überaus guten Voraussetzungen des Schafes als Tiermodell allgemein in der orthopädischen Forschung, sodass der Mehraufwand speziell in der vorliegenden Studie gerechtfertigt war (91).

### *Studiensetup*

#### Pilot-/Hauptphasen

Die geplanten Versuchsabschnitte in den Pilotphasen und der Hauptphase standen unter dem stetigen Verbesserungsgebot der 3R-Strategie.

In den Pilotphasen sollte in Punkto Inokulum Dosierung, Anwendbarkeit und Standardisierung der Weg für die Hauptphase geebnet werden. Ziel war es, den Fokus der Hauptphase auf die PEMF Therapie zu lenken.

Dabei diente die Versuchsanordnung als Rahmen, der fortwährend optimiert werden konnte, um möglichst effektiv auf erlangte Erkenntnisse zu reagieren. So wurde nach den jeweiligen Versuchsabschnitten alle involvierten Parteien in die Versuchsauswertung und Planung des nächsten Schrittes involviert. Der maximale Austausch von Informationen war äußerst zielführend und allen voran aus Tierschutzgründen maßgebend.

#### 3R-Strategie und Statistik

Zu Beginn der Studie stellte sich die Frage nach einem möglichen Heilungserfolg durch die PEMF Therapie bei einer *S. aureus* Infektion. Zunächst erfolgte die Planung eines geeigneten Tiermodelles mit einer geringen Tieranzahl in den Pilotphasen, mit dem Ziel, die jeweilige Therapie in einer Hauptphase mit Versuchstieren in einer Therapie- und einer Kontrollgruppe zu prüfen.

Die Tieranzahl war aus Ethikgründen von vornerein gering gewählt, da die Grenzen einer solchen Studie in der Zumutbarkeit der Versuchsanordnung für das Versuchstier liegen. Darüber hinaus liessen sich bezüglich der Höhe der Inokulumkonzentration sowie der Optimierung der Operationstechnik auch bei der geringen Anzahl von Versuchstieren aussagekräftige Erkenntnisse gewinnen. Auch wenn durch die Versuchsanordnung bzw. deren spätere Optimierung die Bedürfnisse des Versuchstieres erfüllt werden konnten, so erfolgt ein Tierversuch stets unter den strengen Auflagen und unter der Prämisse: «so viel wie nötig, so wenig wie möglich».

Nach den erlangten Ergebnissen nach der Pilotphase-3 stellte sich die Frage, ob ein Tierversuch zur Bewertung der vorliegenden Fragestellung geeignet ist. Die Vermutung

---

lag nahe, dass zunächst eine Änderung in der Versuchsanordnung vorgenommen werden müsste. Folglich wurden aus den Pilotphasen die jeweiligen positiven Ergebnisse und Erkenntnisse gezogen, die Hauptphase und eine etwaige Statistik aus Tierschutzgründen jedoch nicht durchgeführt.

### *Fazit*

Nach Abschluss der Pilotphasen liegen Erkenntnisse und Standards vor, um mit dem etablierten Tiermodell erneut eine Studie in einer Hauptphase zu entwerfen.

## **5.1.2 Lokale akute Osteomyelitis**

Neben der Etablierung eines geeigneten Tiermodells galt es, die gewünschte lokal begrenzte, akute, fortbestehende und nicht systemische Osteomyelitis herzustellen und zu standardisieren. Die Auswahl des geeigneten Erregers, dessen korrekte Dosierung, die Operationsabläufe beim Setzen des Defekts sowie das postoperative Treatment bildeten die zweite Grundlage, um mess- und vergleichbare Ergebnisse erzielen zu können und gleichzeitig die Symptomatik der Infektion mit ihren negativen Folgen für das Versuchstier zu minimieren.

### *Inokulum*

Es ist bekannt, dass in Anwesenheit eines Implantates die Bakterienanzahl klein sein kann um eine persistierende Infektion zu unterhalten. Grundsätzlich ist dies bei allen Bakterien möglich. Zimmerli zeigt in einem Meerschweinchen Modell, dass selbst 100 *S. aureus* Bakterien eine Implantat-assoziierte Infektion auslösen können (57). Jedoch ist das Bakterium *S. aureus* das am Häufigsten gewählte Bakterium in Tierinfektionsmodellen (13, 38-40).

Den Keim zeichnet aus, dass er auch niedrig dosiert und mit einem geringen Volumen «funktioniert».

In der vorliegenden Studie musste das Inokulum von  $2 \times 10^5$  KbE auf  $1 \times 10^4$  KBE gesenkt werden, da die Infektion sich mit der höheren Konzentration zu stark ausbreiten konnten. Selbst bei tieferen Konzentrationen zeigte sich jedoch eine persistierende Bakterienkonzentration, ohne dass die körpereigene Abwehr die Bakterien eliminieren konnte. Als Maßstab orientierte man sich bei der Inokulum Konzentration an den bereits durchgeführten Osteomyelitis-Versuchen im Schafmodell, bei denen die Konzentration im Schnitt bis  $1 \times 10^8$  betrugen, um eine lokale Osteomyelitis zu induzieren (17, 85, 93).

Beim Operationsschritt nach dem Setzen des Inokulums in die zwei Defektlokalisationen und dem Verschließen mit dem Knochenblock bestand aufgrund dessen hohen Volumens die Gefahr des Inokulum Austrittes in das umliegende Gewebe. Während der In-Life-Phase zeigten die Versuchstiere der Pilotphase-1 mitunter die stärksten Gewebereaktionen und Entzündungsanzeichen an der ROI, gefolgt von Lahmheit, hohem lokalem Schmerzempfinden und letztendlich dem schlechten Allgemeinbefinden in den darauffolgenden Tagen. Man kam zu dem Schluss, dass die Inokulum Konzentration sowie das Volumen zu hoch gesetzt waren und reduzierte für die folgenden Pilotphasen beides auf eine Konzentration von  $1 \times 10^4$  KbE in 20  $\mu$ l Volumen pro Defektlokalisation. Die Anpassung des Inokulum Volumens an die Größe des gesetzten Knochendefektes erwies sich als richtig. Nach dem Einsetzen des Inokulums und dem darauffolgenden Verschließen via Schrauben, bzw. Knochenblock, konnte somit ein Auslaufen aus dem Defekt vermieden werden.

Dieses Inokulum mit dem *Staphylokokkus aureus* Stamm ATCC 25923 zeichnete sich durch eine lokal bleibende, nicht systemische Infektion folglich ohne Sepsis aus. Wir gehen davon aus, dass bei längerer Infektion sich eine chronische Infektion entwickeln würde. Da In den folgenden Pilotphasen zeigte sich, dass ein *S. aureus* Inokulum eine lokale Osteomyelitis induzierte, die nicht vorübergehend war, sondern darüber hinaus den Übergang zu einer chronischen Osteomyelitis Form geschaffen hatte, ohne eine Sepsis auszulösen.

Damit hat sich die Bakterienkultur *S. aureus* ATCC 25923 wie bereits in vorhergehenden Studien im Schafmodell (44) als sehr geeignet erwiesen, um ein Inokulum herzustellen und die gewonnen Proben zu quantifizieren.

### *Operationstechnik*

Die Operationsmethodik zum Setzen des Inokulum wurde nach Abschluss der Pilotphase-1 angepasst. Wurden in Pilotphase noch zwei Defekte (Femurkondylus und Tibia) gesetzt, wurde in den folgenden Phasen auf das Setzen des Defektes im Femurkondylus verzichtet. Der Verzicht auf diesen Operationsschritt wurde aufgrund deutlicher Ausbildung einer Sepsis mit lytischem und nekrotischem Gewebe auch innerhalb des Kniegelenkes entschieden. Ebenso wurde das Überbrücken des Kniegelenkes mit Kabel außerhalb der Gelenkkapsel vermieden, da sich in der Pilotphase-1 die Bakterien und folglich die Infektion entlang der Kabelbahnen auch in das Kniegelenk hinein ausbreiteten.

---

Neben dem vermeintlichen Austritt des Inokulums post OP aufgrund dessen großen Volumens kann auch die Operation in direkter Gelenksnähe an sich ein zusätzliches Risiko mit sich bringen.

So besteht die Möglichkeit, dass beim Setzen des Bohrloches und dem Einsetzen der BISS -Schraube die Gelenkmembran verletzt wurde und so intraoperativ ein Zugang ins Gelenk geschaffen wurde, der einen «Weg» für die gesetzten Keime all zu leicht eröffnete. Eine Bohrung am medialen Femurkondylus vorzunehmen, stellt an sich eine gesteigerte Gefahr einer Sepsis dar, da die Femurkondylen die Gelenkkapsel umgreifen und diese direkt am Kniescheibengelenk (Articulatio femoropatellaris) beteiligt sind.

Eine ähnliche Verletzung kann auch beim Setzen des Tibia-Defekts erfolgen, ist jedoch unwahrscheinlicher, da der Defekt dem Gelenk entfernter liegt und die Tibia das Gelenk nicht umgreift.

Neben der kritischen Lage in Gelenksnähe besteht zudem die Vermutung, dass das gleichzeitige Vorhandensein zweier Defekte mit einer hohen Inokulum Dosierung das jeweilige Knochenareal inflammatorisch überforderte und sich eine Infektion ungehindert ausbreiten konnte.

Das Setzen von zwei Defekten, davon einem in kritischer Nähe zum Gelenk, erwies sich operativ als zu risikobehaftet und ist vermutlich ohne zusätzliche Gabe von Antibiotika (auf die aufgrund des Studiensetups und Zieles verzichtet werden sollte) nicht mit dem Tierwohl in Einklang zu bringen. Auch wenn der zusätzliche Defekt im Femurkondylus zusätzliche Erkenntnisse hätte erbringen können, wurde dieser Operationsschritt ab der Pilotphase-2 unterlassen und so nur eine Defektlokalisation ab der Pilotphase-2 pro Versuchstier durchgeführt, da eine gesetzte Infektion im medialen Femurkondylus das Risiko einer Gelenksinfektion aus anatomischen Gegebenheiten am wahrscheinlichen erhöhte.

Der Defekt an der Tibia war in allen drei Pilotphasen intraoperativ gut zu markieren und zu setzen. Nach der zusätzlichen Anpassung der Inokulum Konzentration sowie Volumen wies der gesetzte Tibiadeфекt ab der Pilotphase-2 eine zufriedenstellende Entwicklung der Infektion auf.

Das abschließende Verkleben der OP Wunde erwies sich in Hinblick auf die makroskopische Beurteilung der Pilotphase-1 als erfolgreich. Ein Vernähen der Wunde hätte unter dem Druck der Gewebeswellung und der zusätzlichen Gewebe- und Gelenksflüssigkeiten zum Austreten von Keimen führen können. In den durchgeführten



Pilotphasen blieb die OP Wunde stets verschlossen, wodurch eine Kontamination der Wunde als auch des Stalles vermieden werden konnte.

### *Medikation*

Die Pilotphasen wurden ebenfalls dazu genutzt, die Schmerzmedikation bei Osteomyelitis Modellen zu optimieren. Eine besondere Herausforderung hierbei stellte der durch das Studiensetup vorgegebene Verzicht auf eine begleitende medikamentöse antibakterielle Therapie dar. Untersucht werden sollte die mögliche Therapiewirkung einer solitären PEMF auf eine gesetzte Infektion und Setzen einer lokalen Osteomyelitis ohne weitere antibakterielle Therapie. Es wurde das Ziel verfolgt, mit möglichst geringer Medikation bestmögliche Schmerzausschaltung u.a. in den ersten Tagen post OP zu gewährleisten.

Wie bei orthopädischen Tiermodellen mit Schafen standardisiert, wurden in den Pilotphase-1 Carprofen, Buprenorphin und Paracetamol angewendet.

Da Carprofen sowohl eine schmerzausschaltende als auch eine entzündungshemmende Wirkung besitzt, wurde unter einem strengen Monitoring und unter dem Leitsatz „so viel wie nötig, so wenig wie möglich“ verabreicht (94). Es sollte möglichst verhindert werden, dass die entzündungshemmende Wirkung des Carprofen bei einer hohen Dosierung und durchgehender Gabe die Entstehung eine lokale Infektion unterbindet. Folglich wurde sichergestellt, dass Carprofen bei starken Schmerzverhalten möglichst in Kombination mit Paracetamol und Buprenorphin verabreicht wurde (95).

Die Kombination mit Buprenorphin erwies sich als erfolgreich. Eine Schmerzmedikation mit Paracetamol hingegen erwies sich zu keinem Zeitpunkt der Studie als effektiv. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass bei Paracetamol ein Wirkmechanismus vermutet wird, bei dem eine Hemmung der Prostaglandinsynthese in erster Linie im Gehirn erfolgt und so keine positive Wirkung bei einer lokal gesetzten Infektion erzielt werden kann (96, 97).

Zusammenfassend erwies sich die kombinierte Gabe von Carprofen (4mg/kg KGW) mit Buprenorphin (0,01 mg/kg KGW) in der akuten Infektionsphase als effektiv. Nach Abklingen von Schmerzen und Lahmheit wurde die Buprenorphin Gabe ausgeschlichen und die Dosierung von Carprofen auf die Hälfte reduziert. Hierdurch wurde ein zufriedenstellender Grad an Schmerzausschaltung ohne verfälschende Effekte auf die Entwicklung der lokalen Infektion sichergestellt.

---

## *Fazit*

Das Zusammenspiel der Operationstechniken, der Wahl eines gut dosierten und für einen Tibiadefekt passenden Inokulums und einer abgestimmten Medikation, bilden ein Basis Setting für eine stabile akute Osteomyelitis beim Schaf ohne Antibiose bei bestmöglicher Schmerzausschaltung und damit Verträglichkeit für das Versuchstier.

### **5.1.3 Befunderhebung und Auswertung**

Die Erfassung von Befunden zum Verlauf der Infektion sowie Erfolgskontrolle der Therapie umfassten neben technischen Verfahren zur Bildgebung am Knochengewebe und Histologie auch besonders die dauerhafte klinische Bewertung von Verhalten und Symptomentwicklung. Um die erzielten Befunde und Ergebnisse auch für Dritte nutz- und interpretierbar zu machen, ist eine standardisierte Dokumentation aller relevanten Parameter unabdingbar.

#### *Klinische Bewertung*

Die tägliche allgemeine klinische Untersuchung wie Untersuchungen der ROI erfolgten anhand zweier, im Laufe der Studie optimierter Bewertungsbögen (Anhand Tab. 8.1 bis 8.3 zu entnehmen). Die Kombination aus einem zahlenbasierten Bewertungssystem und Kommentierungen stellt dabei sicher, dass das Scoring unabhängig von der bewertenden Person vergleichbar und standardisiert ist.

Bei der Bewertung bzw. der Einarbeitung sollte das medizinische Personal stetig einheitlich geschult werden, da selbst ein zahlenbasierendes Bewertungssystem Raum für divergierende Interpretationen lässt. So ist eine «mittelgradige Lahmheit» nach oben und unten skalierbar. Festzustellen ist, dass die genaue Festlegung und Definition des jeweiligen Schweregrades beispielsweise einer Lahmheit oder Schwellung festgelegt werden muss, um eine subjektive Bewertung in der Diagnostik zu vermeiden. Es ist darüber hinaus empfehlenswert, theoretische sowie praktische Falldefinitionen aufzuzeigen, um eine möglich einheitliche objektives und detaillierte Bewertung der klinischen Untersuchungen zu gewährleisten.

Weiter war positiv ausschlaggebend, die Bewertungen stets durch das gleiche medizinische Personal durchzuführen. So sollen subjektive abweichende diagnostische Bewertungen minimiert werden, um eine maximal vergleichbare Auswertbarkeit zu erzielen. Die intensive und zeitaufwendige Betreuung der Versuchstiere machte es erforderlich, dass Untersuchungen von verschiedenen Personen durchgeführt wurden.

Hier zeigten sich sowohl der Nutzen sowohl auch die Grenzen der standardisierten Bewertungsbögen.

Die täglichen Untersuchungen der ROI an der Hintergliedmaße konnten mithilfe der Bewertungsbögen unter den vorgenannten Gesichtspunkten zufriedenstellend evaluiert werden. Anzumerken ist, dass die ersten Entzündungsanzeichen wie Wärme, Schwellung und oder Schmerzhaftigkeit frühzeitig diagnostiziert und detailliert evaluiert wurden (26). Grund für das klinische Erscheinungsbild könnten zu dem Zeitpunkt Markraumabszesse durch eine Vermehrung des Keimes sowie im weiteren Verlauf die Resorption von Knochengewebe gewesen sein (20).

Die postmortale makroskopische Auswertung belegte den jeweiligen Status dieser entzündlichen Veränderungen durch spätere lytisches und nekrotisches Weichteilgewebe und osteolytisches Knochengewebe.

Auch die Auswirkungen der PEMF Therapie konnten über die Bewertungsbögen zufriedenstellend evaluiert werden. Die vorzeitige Reduktion der akuten Entzündungszeichen in der Pilotphase-3 im Vergleich zu der nicht behandelten Versuchsgruppe der Pilotphase-2, konnte noch vor der postmortalen makroskopischen Auswertung festgestellt werden.

Damit befanden sich Befunde aus der klinischen Bewertung mit den weiteren Befunden pre- und post mortem in Einklang bzw. stützen diese. Eine Ausnahme hierbei stellten die röntgenologischen Aufnahmen dar. Diese waren in keinem Abschnitt der Studie mit den makroskopischen Ergebnissen übereinstimmbar.

### *Röntgen*

Die radiologischen Kontrollaufnahmen wurden genutzt, um die Position der eingesetzten Implantate zu überprüfen. Durch die Kontrollaufnahmen im Abstand von ein bis zwei Wochen sollten auch die ersten Anzeichen einer Osteomyelitis, wie Periostreaktion oder osteolytische Läsionen, röntgenologisch aufgezeichnet werden.

Das Erscheinungsbild einer akuten Osteomyelitis ist allerdings sehr differenziert und die radiologische Diagnostik einer solchen nicht sehr aussagekräftig, da im frühen Stadium einer akuten Osteomyelitis nur leichte Veränderungen wie Schwellungen oder vaskuläre Reaktionen auftreten (34, 98), die röntgenologisch nur unzureichend sichtbar gemacht werden können. Erst im fortschreitenden Verlauf (ab zwei Wochen nach Beginn einer etablierten Knocheninfektion) treten Ödembildungen und/oder Osteodestruktionen sichtbar durch unscharfe berandete Aufhellungszonen an der Knochenmetaphyse auf. Da

---

die ersten röntgenologischen Aufnahmen nur Tage oder später sieben bzw. 14 Tage Post OP erfolgten, waren in der vorliegenden Studie keine derartigen Veränderungen auffindbar.

Eine Bildgebung durch Magnetresonanztomographie (MRT) und/oder Computertomographie (CT), wie sie heutzutage aufgrund der sehr guten Kontrastauflösung bei Weichteilstrukturen schon routinemäßig in der Osteomyelitis Diagnostik (auch bei Frühstadien) erfolgreich verwendet werden wären demnach der Röntgendiagnostik vorzuziehen (99). Diese wären auch in einer Infektstudie mit Implantaten der Fall.

Der Vorteil in den MRT Aufnahmen liegt in dem hohen sehr detaillierten Weichteilkontrast, so liefern sie beispielsweise bei Knochenmarksveränderungen wie Knochennekrosen eine höhere Sensitivität der Nachweisbarkeit als röntgenologische Aufnahmen (25, 100). Zwar lässt sich Knochengewebe aufgrund der geringen Fett- und Wasserinhaltes schlechter darstellen, wichtig dabei ist allerdings, dass bei Entzündungsprozessen im Knochen ein höherer Wasseranteil durch die gesteigerte Durchblutung zu messen ist. Folglich wären v.a. die Gewebereaktionen einer akuten Knocheninfektion in MRT Aufnahmen gut sichtbar und Entzündungsprozesse somit vorzeitig zu erkennen. MRT sind gegenüber CT- Aufnahmen besser geeignet, um beispielsweise auch Abszesse durch den sehr guten Weichteilkontrast frühzeitig zu erkennen (32, 34).

Der Nachteil vom MRT ist, dass das Aufnahmeumfeld eines MRT sehr lange laut sind und die Aufnahmedauer verhältnismäßig lang ist. Das Versuchstier müsse für die MRT wie auch für die CT Diagnostik sediert werden. Weiter sollte bedacht werden, dass das MRT aufgrund des starken Magnetfeldes sehr anfällig für Bildstörung (Bildartefakte) ist. Studien haben belegt, dass zwar medizinische Metallimplantate wie Titan die diagnostischen Aufnahmen nicht so stark verzerrt wie reiner Stahl, trotzdem hinterlassen Implantate in den meisten Fällen Bildartefakte und Verzerrungen.

CT Aufnahmen stellen überlagerungsfrei Körperstrukturen unterschiedlichster Gewebearten dar und haben eine etwas geringere Sensitivität von Weichteilabszessen und der Erkennung von Osteomyelitiden als MRT Aufnahmen (32). Studien belegen, dass beispielsweise bei der Erkennung von Knochensequestern CT-Aufnahmen eine höhere Wahrscheinlichkeit aufweisen als es bei Röntgenaufnahmen der Fall ist (27, 29).

Ein Nachteil wäre auch hier, dass die Versuchstiere sediert oder die Aufnahmen vor der Auswertung postmortal erfolgen sollten, da ein regungsloser Zustand für eine gute Aufnahme unabdingbar ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwar die röntgenologischen Bilder gut zur Kontrollaufnahmen der gesetzten Implantate, jedoch für das Erkennen einer bakteriellen Knocheninfektion im Frühstadium ungeeignet sind. Zur frühzeitigen Diagnostik des Infektionsverlaufs scheint es sinnvoll, diese in zukünftigen Studien durch weitere Bildgebungsverfahren (MRT oder CT) zu ergänzen.

### *Histologie*

Die in Paraffin eingebetteten Proben wurden erfolgreich in Dünnschnitte zur histologischen Evaluierung verarbeitet. Auch die HE- und Braun-Brenn-Färbungen der Schnitte erwiesen sich als geeignet, um eine zufriedenstellende Analyse durchzuführen. Zu Beginn der Studie wurde histologisch eine Infiltration von Lymphozyten und Plasmazellen festgestellt. Das ließ vermuten, dass zum Abschluss der Pilotphase-1 zwar eine Infektion feststellbar war, diese aber noch nicht zur Anwesenheit eines Biofilms geführt hatte. Als histologisch begründeter Hinweis auf die Bildung eines Biofilms könnte eine Unterbindung der Osteoblastose als Vorhandenseins eines Biofilms gedeutet werden. Weiter belegen die histologisch nachgewiesene Organisation von kokkoidalen Bakterien an der Knochenoberfläche sowie der Nachweis von Knochenlyse und Nekroseherde die Manifestation der eingesetzten Bakterienkultur. Dies lässt die Vermutung eines etablierten Biofilms zumindest wahrscheinlich erscheinen.

Das zur histologischen Beurteilung der Knochen und Lymphknotenschnitte erarbeitete Bewertungssystem in tabellarischer Form durch Zahlen und Erläuterung derselben orientierte sich an standardisierten Scores (85, 101, 102). Eine Korrelation der histologischen Befunde und klinischen Diagnosen konnte in beiden Fällen hergestellt werden.

#### **5.1.4 Effekt PEMF**

Nach Etablierung des Tiermodells und Herstellung einer akuten lokalen Osteomyelitis sollte in Pilotphase-3 die generelle Wirkung der PEMF auf die vorliegende akute Infektion geprüft werden.

Die vorliegenden Studien zur Wirkweise von PEMF auf die Entwicklung des Keimwachstum in vitro sowie zur Knochenneubildung führten zu der Annahme, dass die

---

PEMF eine positive Eignung als Therapieform zur Eindämmung einer akuten lokalen Osteomyelitis aufweisen kann (92, 103-105).

Zusammenfassend konnten in Pilotphase 3 deutliche Effekte der PEMF-Therapie auf den Verlauf der Infektion belegt werden. Die festgestellten Effekte auf den Infektionsverlauf weichen jedoch von ursprünglich vermuteter und in der Studie zu belegender Wirkung im Ergebnis deutlich ab.

Liessen die Befunde aus der fortwährenden klinischen Untersuchung in der Inlife-Phase der Pilotphase-3 noch vermuten, dass es zu einer geringgradigen Infektion oder sogar zu einer vollständigen Eindämmung der Infektion gekommen sei, stellte sich postmortal makroskopisch allerdings das Bild einer weit fortgeschrittenen chronischen Osteomyelitis dar mit beschleunigter Abszessbildung und -kapsel dar. Aus dem injizierten Inokulum bildete sich ein etablierter Infekt mit krümeligem Eiter, wie er erst in weit fortgeschrittenen Stadien der Osteomyelitis zu erwarten wäre.

Ursächlich für die «zeitliche Beschleunigung» der Nekroseherde und hochgradigen Abszessbildung kann eine durch die PEMF herbeigeführte Neovaskularisation sein sowie eine gesteigerte Kollagenproduktion und Proteinexpression (103, 106).

Gleichzeitig ließ sich eine hemmende Wirkung auf die Entwicklung der Keimanzahl nicht nachweisen, im Gegenteil wurde ein beschleunigter Infektionsverlauf mit Ausbildung einer chronischen Osteomyelitis festgestellt (103).

Zusammenfassend ergibt sich die Vermutung, dass die verschiedenen Effekte der PEMF sich nicht wie gewünscht ergänzen, sondern in ihrer Überlagerung teils gegensätzliche Entwicklungen hervorriefen. Die Gründe für das Ausbleiben eines positiven Effekts auf die Keimzahl gilt es zu ergründen. Ansatzpunkte finden sich in einer schrittweisen Modifikation des Magnetfeldes; diverse Studien zur PEMF mit unterschiedlicher Feldmodifikation und jeweils unterschiedlichen beabsichtigen, bzw. erzielten Ergebnissen könnten eine Grundlage für eine derartige Modifikation darstellen (103, 105).

## **5.2 Perspektive**

Die vorliegende Studie liefert mit dem standardisierten Tiermodell ein Werkzeug, implantat-assoziierte Knocheninfektionen zu initiieren und das therapeutische Potential von neuartigen Therapien gegen Osteomyelitis zu testen.

Die Ergebnisse zur Wirksamkeit der PEMF-Therapie legen nahe, die PEMF nicht zwangsläufig als Alternative, sondern vielmehr als Ergänzung zur konservativen antibiotischen Therapie zu überprüfen und ggf. anzuwenden.

Studien und Praxis belegen beispielsweise eine gute Wirksamkeit von Flucloxacillin, Gentamicin oder Vancomycin bei der Therapie einer *S. aureus* Infektion (44, 50, 107, 108). Eine positive Wirkung der PEMF als unterstützende Therapie zur Therapie mit gleichzeitiger antibiotischer Therapie und oder chirurgischem Debridement könnte unter geeigneten Studienbedingungen am Tiermodell Schaf untersucht werden, um die positive Wirkung der PEMF zu untersuchen.

Alternativ wäre denkbar, eine etablierte akute Osteomyelitis zunächst konservativ inklusive Ausschöpfung chirurgischer Möglichkeiten (Débridement) zu behandeln (13, 35). Im Anschluss könnte das betroffene Knochen- und Weichteilgewebe mit der PEMF Therapie behandelt werden. So könnte das betroffene Gewebe nach Infektion unterstützt und wie beschrieben eine verstärkte Vaskularisation gefördert werden, was die Abheilung der Osteomyelitis begünstigen könnte.

Bei allen Versuchsansätzen gilt ein Hauptaugenmerk der Modifikation des Magnetfeldes, da sich hier noch wesentliche Stellschrauben für die PEMF an sich darstellen (92, 109). Es verbleibt die Frage, ob eine Überprüfung der PEMF in Verbindung mit konservativer Therapie im Tiermodell mit dem Tierwohl in Einklang zu bringen sein wird. Es steht zu vermuten, dass gerade bei der Herstellung einer längerfristigen chronischen Osteomyelitis inklusive zusätzlicher operativer Eingriffe das Tiermodell an seine Grenzen stößt (3-R) und somit aus Tierschutzgründen schwerlich vertretbar wäre.

Alternativ steht zu prüfen, ob und unter welchen Bedingungen die erlangten Ergebnisse und/oder beschriebene Perspektiven hypothetisch als ergänzende Therapie bei der Behandlung langjähriger chronischer Osteomyelitis Patienten Anwendung finden könnten und in welchem Rahmen hieraus fortführende Erkenntnisse gewonnen werden könnten.

---

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ascherl R, Lechner F, Blumel G. Electrical stimulation of low frequency range in cases of pseudarthroses. Survey of 350 cases. Reconstr Surg Traumatol. 1985;19:106-12.
2. Furlong LM, Rolle U. Injury incidence in elite youth field hockey players at the 2016 European Championships. PLoS One. 2018;13(8):e0201834.
3. Cahill DW, Love LC, Rechtine GR. Pyogenic osteomyelitis of the spine in the elderly. J Neurosurg. 1991;74(6):878-86.
4. Research and Markets: The Future of Orthopaedic Implants, Analysis and Forecasts to 2016-Joint Reconstruction and Spinal Implants Creating Growth Opportunities/ Business Wire (2010). Available: <http://www.businesswire.com/news/home/20100615006333/en/Research-Markets-Future-Orthopaedic-Implants-Analysis-Forecasts#.U3pVb8ZjBuY>. Accessed 19 May 2014.
5. Lee K, Goodman SB. Current state and future of joint replacements in the hip and knee. Expert Rev Med Devices. 2008;5(3):383-93.
6. Cunha BA. Osteomyelitis in elderly patients. Clin Infect Dis. 2002;35(3):287-93.
7. Gunnam R (2010) The future of orthopaedic implants an analysis and forecasts to 2016. GBI Research <https://www.pressreleasepoint.com/future-orthopedic-implants-analysis-and-forecasts-2016>.
8. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. J Bone Joint Surg Am. 1995;77(6):940-56.
9. Trampuz A, Widmer AF. Infections associated with orthopedic implants. Curr Opin Infect Dis. 2006;19(4):349-56.
10. Geipel U, Herrmann M. [The infected implant. Part 1: bacteriology]. Orthopade. 2004;33(12):1411-26; 27-8.
11. Gristina AG. Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone. Clin Orthop Relat Res. 1994(298):106-18.
12. McPherson, MD EJ, Woodson, MD C, Holtom, MD P, et al. Periprosthetic Total Hip Infection: Outcomes Using a Staging System. . Clinical Orthopaedics and Related Research. 2002;403:pp. 8-15.
13. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. N Engl J Med. 2004;350(14):1422-9.
14. Kurtz SM, Lau E, Schmier J, Ong KL, Zhao K, Parvizi J. Infection burden for hip and knee arthroplasty in the United States. J Arthroplasty. 2008;23(7):984-91.
15. Chambers HF. Community-associated MRSA--resistance and virulence converge. N Engl J Med. 2005;352(14):1485-7.
16. Bouchoucha S, Drissi G, Trifa M, Saied W, Ammar C, Smida M, et al. [Epidemiology of acute hematogenous osteomyelitis in children: a prospective study over a 32 months period]. Tunis Med. 2012;90(6):473-8.
17. Schaer TP, Stewart S, Hsu BB, Klivanov AM. Hydrophobic polycationic coatings that inhibit biofilms and support bone healing during infection. Biomaterials. 2012;33(5):1245-54.
18. Park D, Wang J, Klivanov AM. One-step, painting-like coating procedures to make surfaces highly and permanently bactericidal. Biotechnol Prog. 2006;22(2):584-9.
19. Rößler M., Induktion und Prophylaxe Implantat assoziierter Knocheninfektionen am Modell eines antiinfektiv beschichteten Marknagels: eine experimentelle Studie am Kaninchen, in Tierärztliche Fakultät. 2004, LMU: München.
20. Rossmueller B. FS, Han K. and Bockisch A. Bone scintigraphy in children; Kinderszintigraphie im Kindesalter. Nuklearnmediziner. 1997;20(4):pp. 261-80.



21. Kanakaris NK, Paliobeis C, Nlanidakis N, Giannoudis PV. Biological enhancement of tibial diaphyseal aseptic non-unions: the efficacy of autologous bone grafting, BMPs and reaming by-products. *Injury*. 2007;38 Suppl 2:S65-75.
22. Becker H, Weybora W (1986), Pathologie der Osteomyelitis im Kindesalter in: Sauer HG, Ritter G (Hrsg.), *Osteomyelitis im Kindesalter* Gustav Fischer, Stuttgart, S. 1-4.
23. Kreutzer J, Schneider M, Schlegel U, Ewerbeck V, Breusch SJ. [Cemented total hip arthroplasty in Germany--an update]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*. 2005;143(1):48-55.
24. Frommelt L. Principles of systemic antimicrobial therapy in foreign material associated infection in bone tissue, with special focus on periprosthetic infection. *Injury*. 2006;37 Suppl 2:S87-94.
25. SE H, DD S, (Ed.) BW. Musculoskeletal tumors. Magnetic resonance imaging, Vol II, 3rd edition. 1999;Vol. II, 3rd edition:S. 931-76.
26. M V, G L, (Hrsg.) RM. 11. Knochenmark: MRT des Bewegungsapparates. Georg Thieme, Stuttgart – New York. 1997:S. 289-312
27. Tumeh SS, Aliabadi P, Weissman BN, McNeil BJ. Disease activity in osteomyelitis: role of radiography. *Radiology*. 1987;165(3):781-4.
28. Magnuson JE BM, Hauser MF, Berquist TH, Fitzgerald RH, Klee GG. In-111-labeled leukocyte scintigraphy in suspected orthopedic prosthesis infection: comparison with other imaging modalities *Radiology* 168. 1988:235-9.
29. Al-Sheikh W, Sfakianakis GN, Mnaymneh W, Hourani M, Heal A, Duncan RC, et al. Subacute and chronic bone infections: diagnosis using In-111, Ga-67 and Tc-99m MDP bone scintigraphy, and radiography. *Radiology*. 1985;155(2):501-6.
30. Duszynski DO, Kuhn JP, Afshani E, Riddlesberger MM, Jr. Early radionuclide diagnosis of acute osteomyelitis. *Radiology*. 1975;117(2):337-40.
31. Capitanio MA, Kirkpatrick JA. Early roentgen observations in acute osteomyelitis. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*. 1970;108(3):488-96.
32. Beltran J, McGhee RB, Shaffer PB, Olsen JO, Bennett WF, Foster TR, et al. Experimental infections of the musculoskeletal system: evaluation with MR imaging and Tc-99m MDP and Ga-67 scintigraphy. *Radiology*. 1988;167(1):167-72.
33. Morrison WB, Schweitzer ME, Bock GW, Mitchell DG, Hume EL, Pathria MN, et al. Diagnosis of osteomyelitis: utility of fat-suppressed contrast-enhanced MR imaging. *Radiology*. 1993;189(1):251-7.
34. Chandnani VP, Beltran J, Morris CS, Khalil SN, Mueller CF, Burk JM, et al. Acute experimental osteomyelitis and abscesses: detection with MR imaging versus CT. *Radiology*. 1990;174(1):233-6.
35. Mader JT, Cantrell JS, Calhoun J. Oral ciprofloxacin compared with standard parenteral antibiotic therapy for chronic osteomyelitis in adults. *J Bone Joint Surg Am*. 1990;72(1):104-10.
36. Crane LR, Kapdi CC, Wolfe JN, Silberberg BK, Lerner AM. Xeroradiographic, bacteriologic, and pathologic studies in experimental staphylococcus osteomyelitis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1977;156(2):303-14.
37. Stemberger A., Personal Communication. 2006.
38. Harris LG, Richards RG. Staphylococci and implant surfaces: a review. *Injury*. 2006;37 Suppl 2:S3-14.
39. Torres VJ, Stauff DL, Pishchany G, Bezbradica JS, Gordy LE, Iturregui J, et al. A *Staphylococcus aureus* regulatory system that responds to host heme and modulates virulence. *Cell Host Microbe*. 2007;1(2):109-19.
40. Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*. 2003;185(3):1027-36.

- 
41. Taylor RK, Hall MN, Enquist L, Silhavy TJ. Identification of OmpR: a positive regulatory protein controlling expression of the major outer membrane matrix porin proteins of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 1981;147(1):255-8.
  42. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985;22(6):996-1006.
  43. Galanakis N, Giamarellou H, Moussas T, Dounis E. Chronic osteomyelitis caused by multi-resistant Gram-negative bacteria: evaluation of treatment with newer quinolones after prolonged follow-up. *J Antimicrob Chemother.* 1997;39(2):241-6.
  44. Stewart S, Barr S, Engiles J, Hickok NJ, Shapiro IM, Richardson DW, et al. Vancomycin-modified implant surface inhibits biofilm formation and supports bone-healing in an infected osteotomy model in sheep: a proof-of-concept study. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94(15):1406-15.
  45. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;322:207-28.
  46. D. Mack M, H. Rohde, L.G. Harris, A.P. Davies, M.A. Horstkotte, J.K.-M. Knobloch. Biofilm Formation in Medical Device-Related Infection 2006;29 (4):343-59.
  47. Sheehan E, McKenna J, Mulhall KJ, Marks P, McCormack D. Adhesion of *Staphylococcus* to orthopaedic metals, an in vivo study. *J Orthop Res.* 2004;22(1):39-43.
  48. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(2):114-22.
  49. Webb JS, Givskov M, Kjelleberg S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6(6):578-85.
  50. Monzon M, Garcia-Alvarez F, Lacleriga A, Gracia E, Leiva J, Oteiza C, et al. A simple infection model using pre-colonized implants to reproduce rat chronic *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and study antibiotic treatment. *J Orthop Res.* 2001;19(5):820-6.
  51. Diefenbeck M, Muckley T, Hofmann GO. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics. *Injury.* 2006;37 Suppl 2:S95-104.
  52. Ibrahim K., Die Entwicklung eines „drug delivery system“ auf Basis einer Poly-D, L-Laktatbeschichtung für den Einsatz an Biomaterialien in der Medizin, in medicin. 2005, TUM: munich.
  53. Metsemakers WJ, Schmid T, Zeiter S, Ernst M, Keller I, Cosmelli N, et al. Titanium and steel fracture fixation plates with different surface topographies: Influence on infection rate in a rabbit fracture model. *Injury.* 2016;47(3):633-9.
  54. Gristina A. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. 1987. *Clin Orthop Relat Res.* 2004(427):4-12.
  55. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000;40(2):175-9.
  56. Marshall KC. Adsorption and adhesion processes in microbial growth at interfaces. *Adv Colloid Interface Sci.* 1986;25(1):59-86.
  57. Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis.* 1982;146(4):487-97.
  58. Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science.* 1987;237(4822):1588-95.

59. Richards R.G., Introduction: Implants and infection in fracture fixation "ten years on". *Injury - Infection in Fracture Fixation. From basic research, to diagnosis, to evidence-based treatment*, 2006. 37(2, Supplement 1): p. S1-S2.
60. Richards R.G., et al., Antiseptics and antibiotics on implants. *Injury - Infection in Fracture Fixation. From basic to research, to diagnosis, to evidence-based treatment*, 2006. 37(2, Supplement 1): p. S113-S116.
61. Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury*. 2006;37 Suppl 2:S105-12.
62. Ritter MA, Olberding EM, Malinzak RA. Ultraviolet lighting during orthopaedic surgery and the rate of infection. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89(9):1935-40.
63. Edmondson HT. Parenteral and oral clindamycin therapy in surgical infections: a preliminary report. *Ann Surg*. 1973;178(5):637-42.
64. Grondin C, St-Martin M, Potvin A. Lincomycin and Staphylococcal Infections: A Clinical Study of 18 Cases. *Can Med Assoc J*. 1965;92:1062-5.
65. Victoria G, Petrisor B, Drew B, Dick D. Bone stimulation for fracture healing: What's all the fuss? *Indian J Orthop*. 2009;43(2):117-20.
66. Lechner F, Oeller G, Ascherl R. [Treatment of infected pseudoarthroses with electrodynamic field therapy]. *Fortschr Med*. 1979;97(20):943-9.
67. Lechner F, Ascherl R, Uraus W. Treatment of pseudarthroses with electrodynamic potentials of low frequency range. *Clin Orthop Relat Res*. 1981(161):71-81.
68. Bassett CA, Caulo N, Kort J. Congenital "pseudarthroses" of the tibia: treatment with pulsing electromagnetic fields. *Clin Orthop Relat Res*. 1981(154):136-48.
69. Ciombor DM, Aaron RK. The role of electrical stimulation in bone repair. *Foot Ankle Clin*. 2005;10(4):579-93, vii.
70. Kraus W., et al., 306. Die Therapie des Knochens mit infrasonischer elektro- und magnetodynamischer Energie nach W. Kraus und F. Lechner. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 1979. V349(1): p. 629-630.
71. Krüger T., Magnetisch induzierte Elektrostimulation der Distraktionsosteogenese - biomechanische, computertomografische und histologische Untersuchungen zur diaphysären Beinverlängerung im Tiermodell. 2002, Wittenberg, Univ., Habil.-Schr., 2002: Halle. p. 150 S.
72. Schimmelpfeng J. and Dertinger H., Action of a 50 Hz magnetic field on proliferation of cells in culture. *Bioelectromagnetics*, 1997. 18(2): p.177-183.
73. Otto M.W., McLeod K.J., and Rubin C.T., Effects of electromagnetic fields in experimental fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*, 1998(355 Suppl): p. S90-104.
74. Kuzyk PR, Schemitsch EH. The science of electrical stimulation therapy for fracture healing. *Indian J Orthop*. 2009;43(2):127-31.
75. Pazur A. Characterisation of weak magnetic field effects in an aqueous glutamic acid solution by nonlinear dielectric spectroscopy and voltammetry. *Biomagn Res Technol*. 2004;2(1):8.
76. Schulten K. and Weller A., Magnetfeldeffekte in Chemie und Biologie. *Die Umschau*, 1984. 25/26: p. 779-783.
77. Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM. An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed Mater Eng*. 1998;8(1):1-9.
78. Apelt D, Theiss F, El-Warrak AO, Zlinszky K, Bettschart-Wolfisberger R, Böhner M, et al. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials*. 2004;25(7-8):1439-51.
79. Mapara M, Thomas BS, Bhat KM. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012;9(1):111-8.

- 
80. An YH, Kang QK, Arciola CR. Animal models of osteomyelitis. *Int J Artif Organs*. 2006;29(4):407-20.
  81. Kishor C, Mishra RR, Saraf SK, Kumar M, Srivastav AK, Nath G. Phage therapy of staphylococcal chronic osteomyelitis in experimental animal model. *Indian J Med Res*. 2016;143(1):87-94.
  82. Andriole VT, Nagel DA, Southwick WO. Chronic staphylococcal osteomyelitis: an experimental model. *Yale J Biol Med*. 1974;47(1):33-9.
  83. Nelson DR, Buxton TB, Luu QN, Rissing JP. An antibiotic resistant experimental model of *Pseudomonas* osteomyelitis. *Infection*. 1990;18(4):246-8.
  84. Passl R, Muller C, Zielinski CC, Eibl MM. A model of experimental post-traumatic osteomyelitis in guinea pigs. *J Trauma*. 1984;24(4):323-6.
  85. Horst SA, Hoerr V, Beineke A, Kreis C, Tuchscher L, Kalinka J, et al. A novel mouse model of *Staphylococcus aureus* chronic osteomyelitis that closely mimics the human infection: an integrated view of disease pathogenesis. *Am J Pathol*. 2012;181(4):1206-14.
  86. Rissing JP, Buxton TB, Weinstein RS, Shockley RK. Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infect Immun*. 1985;47(3):581-6.
  87. Sarkar MR, Wachter N, Patka P, Kinzl L. First histological observations on the incorporation of a novel calcium phosphate bone substitute material in human cancellous bone. *J Biomed Mater Res*. 2001;58(3):329-34.
  88. Lippuner K, Vogel R, Tepic S, Rahn BA, Cordey J, Perren SM. Effect of animal species and age on plate-induced vascular damage in cortical bone. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1992;111(2):78-84.
  89. Lanyon LE, Hampson WG, Goodship AE, Shah JS. Bone deformation recorded in vivo from strain gauges attached to the human tibial shaft. *Acta Orthop Scand*. 1975;46(2):256-68.
  90. Treangen TJ, Maybank RA, Enke S, Friss MB, Diviak LF, Karaolis DK, et al. Complete Genome Sequence of the Quality Control Strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923. *Genome Announc*. 2014;2(6).
  91. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*. 2007;13:1-10.
  92. Inoue N, Ohnishi I, Chen D, Deitz LW, Schwardt JD, Chao EY. Effect of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on late-phase osteotomy gap healing in a canine tibial model. *J Orthop Res*. 2002;20(5):1106-14.
  93. Achermann Y, Tran B, Kang M, Harro JM, Shirtliff ME. Immunoproteomic Identification of In Vivo-Produced *Propionibacterium acnes* Proteins in a Rabbit Biofilm Infection Model. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;22(5):467-76.
  94. Mathews KA. Nonsteroidal anti-inflammatory analgesics in pain management in dogs and cats. *Can Vet J*. 1996;37(9):539-45.
  95. KuKanich B, Lascelles BD, Papich MG. Pharmacokinetics of morphine and plasma concentrations of morphine-6-glucuronide following morphine administration to dogs. *J Vet Pharmacol Ther*. 2005;28(4):371-6.
  96. Swan GE. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in domestic animals: I. Their classification, mechanism of action and pharmacological effects. *J S Afr Vet Assoc*. 1991;62(1):35-8.
  97. Mburu DN. Evaluation of the anti-inflammatory effects of a low dose of acetaminophen following surgery in dogs. *J Vet Pharmacol Ther*. 1991;14(1):109-11.
  98. Brossmann J, Sartoris DJ, Resnick DL (1999), Osseous and soft tissue infection of extraspinal sites in: Stark DD, Bradley WG (Ed.), *Magnetic resonance imaging*, Vol. II, 3 edition, Mosby, St. Louis - Baltimore - Boston - Carlsbad - Chicago - Minneapolis

- New York - Philadelphia - Portland - London - Milan - Sydney - Tokyo - Toronto. S. 1037-1056.

99. Moore SG, Bisset III GS, Siegel MJ, Donaldson JS (1991), Pediatric musculoskeletal MR imaging, *Radiology* 179, 345-360.
100. Epstein RE D, Stark DD, Bradley WG (Ed.). Ischemic Necrosis. Magnetic resonance imaging, Vol II, 3rd edition. 1999;2:1021-36.
101. Tiemann A, Hofmann GO, Krukemeyer MG, Krenn V, Langwald S. Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score (HOES) - an innovative approach to histopathological diagnostics and scoring of osteomyelitis. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW*. 2014;3:Doc08.
102. Jennings JA, Beenken KE, Skinner RA, Meeker DG, Smeltzer MS, Haggard WO, et al. Antibiotic-loaded phosphatidylcholine inhibits staphylococcal bone infection. *World J Orthop*. 2016;7(8):467-74.
103. Dauben TJ, Ziebart J, Bender T, Zaatreh S, Kreikemeyer B, Bader R. A Novel In Vitro System for Comparative Analyses of Bone Cells and Bacteria under Electrical Stimulation. *Biomed Res Int*. 2016;2016:5178640.
104. Obermeier A. MFD, Friess W., Sternberger A. Growth inhibition of staphylococcus aureus induced by low-frequency electric and electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 2009 May;30(4):270-9.
105. Fojt L, Strasak L, Vetterl V, Smarda J. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* and *Staphylococcus aureus*. *Bioelectrochemistry*. 2004;63(1-2):337-41.
106. Assiotis A, Sachinis NP, Chalidis BE. Pulsed electromagnetic fields for the treatment of tibial delayed unions and nonunions. A prospective clinical study and review of the literature. *J Orthop Surg Res*. 2012;7:24.
107. Dart AJ, Hodgson DR. Surgical management of osteomyelitis of the sustentaculum tali in a horse. *Aust Vet J*. 1996;73(2):73-4.
108. Yin LY, Lazzarini L, Li F, Stevens CM, Calhoun JH. Comparative evaluation of tigecycline and vancomycin, with and without rifampicin, in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* experimental osteomyelitis in a rabbit model. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(6):995-1002.
109. Bassett CA, Valdes MG, Hernandez E. Modification of fracture repair with selected pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg Am*. 1982;64(6):888-95.


---

## 7 Abkürzungsverzeichnis

®	Registered
™	Trademark
%	Prozent
Ø	Durchschnitt
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ad us. vet.	ad usum veterinarium
ATCC	American Type Culture Collection
B	Breite
BSL	biologische Schutzstufe
ca.	circa
CFU	colony forming unit
cm	Zentimeter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
ggr.	geringgradig
h	Stunde
H	Höhe
HE	Hämatoxylin-Eosin
hgr.	hochgradig
i. m.	intramuskulär
I.U	International Unit
i. v.	intravenös
KbE	Koloniebildende Einheit
Kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
L	Länge
Li	links
M.	Musculus
mgr.	mittelgradig
mg	Milligramm

---

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mV	Millivolt
n=	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
obB	ohne besonderen Befund
OD	optische Dichte
OP	Operation
p. o.	per os
PEMF	Pulsed Electromagnetic Field
Re	Rechts
ROI	Region of Interest
rpm	rounds per minute
Tab.	Tabelle
s. c.	subkutan
Wo	Woche
z. B.	zum Beispiel

Animal ID:		before:		SUPPLEMENTARY OBSERVATION SHEET										 Univers Zürich
Study Number:		after:		SHEEP - GOAT - PIG										
MSRU0101														
Date	Time	Alertness	Posture	Appetite	Respiration	Pain	Lameness	Total (5 - 30)		Additional Diagnostic Findings / Comments**	Initials			
												dd/mm/yy	hh:mm	1

\* 5: no abnormality; 4: mild abnorm.; 3: moderate abnorm.; 2: clear abnorm.; 1: high abnorm.

\*\* Indicate if a treatment was planned/performed by TC → Enter Treatment details on Treatment sheet ONLY

### SUPPLEMENTARY OBSERVATION SHEET LEGEND

form for Sheep-Goat-Pig



**Alertness:**

- 1 not responsive, apathetic
- 2 not interested but responsive
- 3 clearly less interested in its environment
- 4 slightly less interested in its environment
- 5 normal, interested in its environment

**Posture:**

- 1 lying and not standing up when forced to or having great difficulties moving from lying position
- 2 lying but standing up when forced to, standing unstable not moving around
- 3 lying but standing up immediately, standing unstable and moving slowly
- 4 lying more often than normal, moving slowly
- 5 normal physiological posture

**Appetite:**

- 1 not eating
- 2 eating hesitant and discontinuous
- 3 eating less than normal
- 4 eating
- 5 eating very well

**Pain:**

- 1 - 2 sheep: strong pain: discomfort, hanging ears, vocalizing, grinding teeth, inappetance, shaking
- 3 clear signs of discomfort
- 4 slight signs of discomfort
- 5 no pain, normal general condition

**Respiration:**

- 1 abnormal breathing pattern, strong pumping
- 2 slight abnormal pattern and slightly pumping
- 3 normal breathing pattern but slight pumping
- 4 more or less than normal breaths/minute (depending on animal type)
- 5 normal breaths/minutes (depending on animal type)

**Lameness:**

- 1 refuses to bear weight on one limb; may refuse moving or have great difficulty moving from lying position
- 2 arched back standing and walking; one or more limbs favored but can partially bear weight
- 3 stands with arched back; walks with arched back; gait has short strides with one or more limbs
- 4 arches back slightly when walking; gait slightly abnormal
- 5 not lame

Page

*Tabelle 8.1: Bewertungsbogen der klinischen Untersuchung (mit Legende)*





### MSRU0101 OSTEOMYELITIS SCORE SHEET



**35** Maximum total score

**<26** Further observation, therapy where indicated

**<15** Further clinical examination in consultation with a senior veterinarian, therapy is installed and pursued until improvement of the symptoms according to the overall well-being of the animal including food and water intake. This active surveillance/therapy will be administered over a period of 36 hours maximally, with close follow-up. If the well-being does not improve or if it worsens, early termination

**<10** Early termination

**Score 3 in any single parameter:** further observation, therapy where indicated

**Score 2 or <2 in any single parameter:** Further clinical examination in consultation with a senior veterinarian, therapy is installed and pursued until improvement of the symptoms according to the overall well-being of the animal including food and water intake

**Therapy:** veterinary medical intervention according to parameter altered from normal, at the discretion of the attending veterinarian in consultation with a senior veterinarian and following MSRU SOP's

If the animal suffering is severe or without prospect of reconvalescence, early termination is performed.

*Tabelle 8.3: Legende der klinischen Handlungsanordnungen*

<b>Evaluation criteria of lymph nodes MSRU0101</b>		
<b>Structure changes</b>	<b>score</b>	<b>Lymph node</b>
none	<b>0</b>	-
mild abnormalities	<b>1</b>	secondary follicle activation, cortex vascular lesions (dilation of blood and/or lymphatic vessels)
moderate abnormalities	<b>2</b>	Localized: Secondary follicle hyperplasia/ follicular depletion (atrophy), lymphatic sinus ectasia, medullar and cortex vascular lesions (dilation of blood and/or lymphatic vessels), macrophage hyperplasia (Histiocytosis-cortical-sinus)
severe abnormalities	<b>3</b>	Whole organ (Cortex, Paracortex, Medulla): Secondary follicle Hyperplasia/ Follicular depletion (atrophy), lymphatic sinus ectasia, medullar and cortex vascular lesions (dilation of blood and/or lymphatic vessels), macrophage hyperplasia (cortical and medullary sinus)
<b>Nonlocal Cells (inflammatory/hypersensitivity cells)</b>	<b>Score</b>	
none	<b>0</b>	-
mild abnormalities	<b>1</b>	inflammatory cells focal/single cells
moderate abnormalities	<b>2</b>	inflammatory cells multifocal/several cells
severe abnormalities	<b>3</b>	inflammatory cells multifocal to confluent/high amount
<b>Presence of bacteria</b>	<b>Score</b>	
	<b>0</b>	Not present
	<b>1</b>	slight amount (some single bacteria or less than 2 colonies)/focal
	<b>2</b>	slight to moderate amount/multifocal
	<b>3</b>	severe amount/multifocal to diffuse
Structure changes: deviation from physiological organ structure		

Tabelle 8.4: histologischer Bewertungsbogen für die Lymphknoten (Strukturveränderungen, Entzündungszellen, Anwesenheit von Bakterien)

## MSRU0101 Animal model of bone infection histological score

Modified from Smeltzer et al. 1997/Journal of Orthopaedic Research 15:414-421 and from Petty et al./ Journal of Bone and Joint Surgery Vol.67-A no. 8 Oct 1985

Animal: \_\_\_\_\_ Tibia: ☐ L ☐ R Evaluted by (D/I): \_\_\_\_\_  
ROI: \_\_\_\_\_ Euthanasia timepoint: \_\_\_\_\_

Score	Acute inflammatory components
0	Not present
1	Minimal-to-mild neutrophil granulocytes infiltration with no intramedullary abscess
2	Moderate-to-severe neutrophil granulocytes infiltration with no intramedullary abscess
3	Minimal-to-mild neutrophil granulocytes infiltration with intramedullary abscess
4	Moderate-to-severe neutrophil granulocytes infiltration with intramedullary abscess
Signs of chronic inflammation (Lymphocytes and plasma cells)	
0	Not present
1	Minimal-to-mild chronic inflammation with no significant granulation tissue, fibrotic components
2	Moderate chronic inflammation with some immature granulation tissue, fibrotic components
3	Minimal-to-mild chronic inflammation with significant granulation tissue, fibrotic components
4	Moderate-to-severe chronic inflammation with significant granulation tissue, fibrotic components
Bone necrosis	
0	No evidence of necrosis
1	Single focus of necrosis without sequestrum formation
2	Multiple foci of necrosis without sequestrum formation
3	Multiple foci of necrosis with single sequestrum
4	Multiple Necrosis and sequestra
Presence of bacteria	
0	not present
1	slight amount (some single bacteria or less then 2 colonies)/focal
2	slight to moderate amount/ multifocal
3	moderate amount/multifocal
4	severe amount/multifocal to diffuse

### Additional Comments

*Tabelle 8.5: histologische Bewertungsbogen für die Knochen (akute entzündliche Komponente, Zeichen einer chronischen Entzündung, Knochennekrose, Anwesenheit von Bakterien)*

## MSRU0101 Marvel BC Osteomyelitis Observation

Treatment Group	Animal	Days Post OP	Body Temperature	swelling	swelling score (5-1)	sensitivity to pain	pain score (5-1)	local heat	Local heat score (5-1)	reddening	reddening score (5-1)	discharge	dehiscence	Other Observations
Phase 1 Pilot	101.01	0	38.5-40.0	no	5	unevaluted	-	-	-	-	-	none	wound closed	wound not evaluable because of band-aid (Ioban bandage)
		1	38.5-40.0	no	5	unevaluted	-	slightly warmer than normal	3	mild reddening of the wound	3	none	wound closed	wound not evaluable because of band-aid (Ioban bandage)
		2	38.5-38.9	no	5	unevaluted	-	slightly warmer than normal- moderately warmer than normal	4-3	mild- moderate reddening of the wound	4-3	none	wound closed	wound not evaluable because of band-aid (Ioban bandage)
		3	38.6-38.9	no	5	unevaluted	-	slightly warmer than normal	4	mild reddening of the wound	4	none	wound closed	
		4	38.7-39.0	no	5	unevaluted	-	slightly warmer than normal	4	mild reddening of the wound	4	none	wound closed	
		5	38.9-39.0	no	5	moderate sensitivity to pain	3	slightly warmer than normal	4	no reddening of the wound	5	none	wound closed	
		6	38.8-38.9	moderate	3	sensitivity to pain is low	4	no local heat	5	no reddening of the wound	5	none	wound closed	wound less painful and less warm, M. tibialis cranialis stiffened
		7	38,8	moderate	3	sensitivity to pain is low	4	no local heat	5	no reddening of the wound	5	none	wound closed	after buprenorphine double dose less painful; M. tibialis cranialis

Tabelle 8.6: Zusammenfassung der Ergebnisse des Osteomyelitis Bewertungsbogens Pilotphase-1 - 101.01

**MSRU0101 Marvel BC OsteomyelitisObservation**

Treatment Group	Animal	Days Post OP	Body Temperature	swelling	swelling score (5-1)	sensitivity to pain	pain score (5-1)	local heat	Local heat score (5-1)	reddening	reddening score (5-1)	discharge	dehiscence	Other Observations
Phase 1 Pilot	101.02	0	38.5-40.0	no	5	unevaluted	-	-	-	unevaluated	-	none	wound closed	wound not evaluable because of band-aid (loban bandage)
		1	38.5-40.0	mild	4	unevaluted	-	moderately warmer than normal	3	unevaluated	-	none	wound closed	wound not evaluable because of band-aid (loban bandage); tibialis cranialis muscle slightly hardened and swollen
		2	38.9	mild-no	4-5	unevaluted	-	slightly warmer than normal	4	mild reddening of the wound	4	none	wound closed	band-aid removing; tibialis cranialis muscle slightly hardened and swollen
		3	38.3-39.3	mild-no	4-5	unevaluted	-	slightly warmer than normal	4	mild reddening of the wound	4	none	wound closed	wound is dry
		4	39.3-39.8	mild	4	unevaluted	-	moderately warmer than normal	3	moderate reddening of the wound	3	none	wound closed	wound is dry
		5	39.4-39.9	mild	4	moderate sensitivity to pain	3	moderately warmer than normal	3	moderate reddening of the wound	3	none	moist discharge	slightly exsudative at the ventral area of the wound, tuberositas tibiae as well as tibialis cranialis muscle is painful during palpation
		6	38.4-39.4	mild	4	sensitivity to pain is low	4	slightly warmer than normal	4	mild reddening of the wound	4	none	moist discharge	less pain after buprenorphine administration, wound less painful, crusted and less warm, wound was cleansed
		7	39.0	mild	4	severe sensitivity to pain	2	slightly warmer than normal	4	mild reddening of the wound	4	none	moist discharge	before buprenorphine highly painful

Tabelle 8.7: Zusammenfassung der Ergebnisse des Osteomyelitis Bewertungsbogens Pilotphase-1 – 101.02

## MSRU0101 Marvel BC OsteomyelitisObservation

Treatment Group	Animal	Days Post OP	Body Temperature	swelling	swelling score (5-1)	sensitivity to pain	pain score (5-1)	local heat	Local heat score (5-1)	reddening	reddening score (5-1)	discharge	dehiscence	Other Observations
Phase 2 Non Treated	101.03	0	38.4	mild	4	unevaluted	-	slightly warmer than normal	4		-	none	wound closed	wound not evaluable because of band-aid (loban bandage)
		1	38.0-38.4	mild	4	unevaluted	-	slightly warmer than normal	4	unevaluated	-	none	wound closed	wound not evaluable because of band-aid (loban bandage)
		2	38.8-39.8	mild	4	no sensitivity to pain	5	slightly warmer than normal-moderately warmer than normal	4-3	moderate reddening of the wound	3	none	wound closed	band-aid removing, after removal of loban bandage: mild reddened skin (reaction to loban bandage); mild swelling between proximal tibia and medial tarsus region
		3	38.5	moderate	3	unevaluted	-	slightly warmer than normal	4	moderate reddening of the wound	3	none	wound closed	Betadine on ROI
		4	38.2-38.5	moderate	3	unevaluted	-	slightly warmer than normal	4	moderate reddening of the wound	3	none	wound closed	
		5-8	38.4-38.8	moderate	3	unevaluted	-	slightly warmer than normal	4	moderate reddening of the wound	3	none	wound closed	
		9-11	38.5-39.0	mild-no	4-5	sensitivity to pain is low	4	no local heat	5	no reddening of the wound	5	none	wound closed	
		12-14	38.2-39.0	no	5	unevaluted	-	no local heat	5	no reddening of the wound-mild reddening of the wound	5-4	none	wound closed	
		15-17	38.4-38.7	mild-no	4-5	unevaluted	-	no local heat	5	no reddening of the wound	5	none	wound closed	
		18-20	38.5-39.0	mild	4	unevaluted	-	no local heat	5	no reddening of the wound	5	none	wound closed	

Tabelle 8.8: Zusammenfassung der Ergebnisse des Osteomyelitis Bewertungsbogens Pilotphase-2 - 101.03

**MSRU0101 Marvel BC OsteomyelitisObservation**

Treatment Group	Animal	Days Post OP	Body Temperature	swelling	swelling score (5-1)	sensitivity to pain	pain score (5-1)	local heat	Local heat score (5-1)	reddening	reddening score (5-1)	discharge	dehiscence	Other Observations
Phase 2 Non Treated	101.04	0	38.0	mild	4	unevaluted	-	slightly warmer than normal	4	unevaluated	-	unevaluated	unevaluated	wound not evaluable because of band-aid (Ioban bandage)
		1	38.5	mild	4	unevaluted	-	slightly warmer than normal	4	unevaluated	-	unevaluated	unevaluated	wound not evaluable because of band-aid (Ioban bandage)
		2	38.8-38.9	mild; tibia lateral: moderate swelling	3-4	unevaluted	-	slightly warmer than normal	4	moderate reddening of the wound	3	none	wound closed	band-aid removing; at the lateral of the tibia: hematoma
		3-4	38.9-39.0	mild-moderate	3-4	unevaluted	-	slightly warmer than normal	4	mild reddening of the wound	3	none	wound closed	Betadine on ROI
		5-6	39.0	moderate	3	unevaluted	-	slightly/ moderately warmer than normal	4-3	no reddening of the wound	5	none	wound closed	Betadine on ROI
		7-8	38.6-39.0	moderate	3	medial tibia region to tarsus is painful	2	slightly warmer than normal	4	no reddening of the wound	5	none	wound closed	
		9-13	38.2-39.3	mild	4	slightly painful / sensitivity to pain at ROI	4	no local heat	5	no reddening of the wound	5	none	wound closed	tibia slightly swollen medially distally to the tarsus region (day 12-14)
		14-15	38.8-39.4	mild	4	slightly sensitive to pain at ROI	4	no local heat	5	no/mild reddening of the wound	5-4	none	wound closed	tibia slightly swollen medially distally to the tarsus region (day 12-14)
		16-18	38.9-39.2	mild	4	no sensitivity to pain at ROI	5	no local heat	5	no/mild reddening of the wound	5-4	none	wound closed	
		19-21	38.8-39.2	mild	4	slightly sensitive to pain at ROI	4	no local heat/ slightly warmer than normal	5-4	mild reddening of the wound	4	none	wound closed	

Tabelle 8.9: Zusammenfassung der Ergebnisse des Osteomyelitis Bewertungsbogens Pilotphase-2 - 101.04



## MSRU0101 Marvel BC OsteomyelitisObservation

Treatment Group	Animal	Days Post OP	Body Temperature	swelling	swelling score (5-1)	sensitivity to pain	pain score (5-1)	local heat	Local heat score (5-1)	reddening	reddening score (5-1)	discharge	dehiscence	Other Observations
Phase 3 Treated	101.05	0	38.5	mild	4	moderate sensitivity to pain at ROI	3	slightly warmer than normal	4	unevaluated	-	none	wound closed	wound not evaluable because of band-aid (Ioban bandage)
		1-2	38.7-38.8	mild	4	moderate sensitivity to pain at ROI, day two less sensitivity to pain at ROI	4-3	slightly warmer than normal	4	unevaluated	-	none	wound closed	wound not evaluable because of band-aid (Ioban bandage); day 2: band-aid removing
		3-5	38.8-39.1	mild-moderate	3-4	moderate/ very sensitive to pain on the operated limb, painful expression while touching (=grudge one's theet)	3	slightly warmer than normal	4	reddening of the wound is moderate	4-3	none	wound closed	after Coil treatment: the swelling and and sensitivity to pain are more moderate/higher (adoption: the surgical suture is rubbing against the coil)
		5-6	38.6-39.1	mild	4	moderate sensitivity to pain at ROI, painful expression while touching	4-3	slightly warmer than normal	4	reddening if the wound is mild	4	none	wound closed	Betadine on ROI
		7	38.6-38.8	mild	4	less sensitive to pain at ROI	4-3	slightly warmer than normal	4	no/mild reddening of the wound	5	none	wound closed	Betadine on ROI
		8	38.6-38.7	mild	4	sensitivity to pain at ROI is low (-er)	4-3	slightly warmer than normal	4	mild reddening around wound	4	none	wound closed	Betadine on ROI
		9	38.6-38.7	mild	4	sensitivity to pain at ROI is low	4	slightly warmer than normal	5	mild reddening around wound	4	none	wound closed	Betadine on ROI
		10-14	38.7-39.1	mild-no	4-5	mild sensitivity to pain at ROI/ non	5-4	no local heat	5	mild-non reddening at ROI	5-4	none	wound closed	Betadine on ROI
		15-19	38.4-39.2	mild-no	4-5	non	5	no local heat	5-4	mild-no reddening at ROI	5-4	none	wound closed	
		19-21	38.4-38.8	no	5	non	5	no local heat	5	no reddening at ROI	5	none	wound closed	

Tabelle 8.10: Zusammenfassung der Ergebnisse des Osteomyelitis Bewertungsbogens Pilotphase-3 - 101.05

**MSRU0101 Marvel BC OsteomyelitisObservation**

Treatment Group	Animal	Days Post OP	Body Temperature	swelling	swelling score (5-1)	sensitivity to pain	pain score (5-1)	local heat	Local heat score (5-1)	reddening	reddening score (5-1)	discharge	dehiscence	Other Observations
Phase 3 Treated	101.06	0	38.9	mild	4	moderate sensitivity to pain	3	slightly warmer than normal	4	unevatuated	-	none	wound closed	wound not evaluable because of band-aid (Ioban bandage)
		1	38.5-38.8	moderate-mild	3-4	moderate sensitivity to pain	3	slightly warmer than normal	4	unevatuated	-	none	wound closed	wound not evaluable because of band-aid (Ioban bandage)
		2	38.5-38.6	mild	4	moderate-mild sensitivity to pain at ROI	4-3	slightly warmer than normal	4	reddening of the wound is moderate	3	none	wound closed	wound not evaluable because of band-aid (Ioban Bandage); day 2: band-aid removing
		3-4	39.0-39.1	mild	4	moderate-mild sensitivity to pain at ROI	4-3	slightly warmer than normal	4	reddening of the wound is mild/no reddening	5-4	none	wound closed	
		5-6	38.0-39.1	mild	4	moderate sensitivity to pain at ROI	3	slightly warmer than normal	4	no reddening of the wound	5	none	wound closed	Betadine on ROI
		7-8	38.2-38.6	mild	4	mild sensitivity to pain at ROI	4	slightly warmer than normal	4	no reddening of the wound	5	none	wound closed	Betadine on Roi
		9-10	38.4-39.1	mild	4	mild-no sensitivity to pain at ROI	5-4	no local heat	5	no reddening of the wound	5	none	wound closed	Betadine on ROI
		11-14	38.8-39.1	mild	4	mild-no sensitivity to pain at ROI	5-4	slightly warmer than normal/ no local heat	5-4	no reddening of the wound	5	none	wound closed	Betadine on ROI
		15-18	38.8-39.1	mild	4	no sensitivity to pain at ROI	5	slightly warmer than normal/ no local heat	5-4	reddening of the wound is mild/no reddening	5-4	none	wound closed	
		19-21	38.0-38.7	no	5	no sensitivity to pain at ROI	5	no local heat	5	no reddening of the wound	5	none	wound closed	

*Tabelle 8.11: Zusammenfassung der Ergebnisse des Osteomyelitis Bewertungsbogens Pilotphase-3 – 101.06*

Pilotphasen	Tier	Tag nach OP	Grad des Schmerzverhaltens	Lahmheitsgrad	Medikation (Carprofen, Paracetamol) [Carprofen einfache Dosis SD = 4 mg/kg, halbe Dosis HD = 2 mg/kg] [Paracetamol SD 10 mg/kg]	Medikation (Buprenorphine) [einfache Dosis SD = 0.01 mg/kg KGW, doppelte Dosis DD = 0.02 mg/kg KGW]	
Phase 1	101.01	0	4,00	4,00	Carprofen SD SID	SD QID	
		1		3,00		-	
		2					
		3					
		4	3,50				
		5				DD BID	
		6	4,00	4,00		DD BID, TD SID	
		7	4,00			DD SID (einmalig doppelte Dosis)	
Phase 1	101.02	0	4,00	4,00	Carprofen SD SID	SD QID	
		1	3,00	Carprofen SD SID, Paracetamol SD BID	-		
		2	2,50				
		3	2,00				
		4					
		5	3,50		3,00		DD BID
		6					DD BID, TD SID
		7	3,00	2,00	Carprofen SD SID	DD SID (einmalig doppelte Dosis)	

Tabelle 8.12: relevante Auswertungsergebnisse der klinischen Untersuchungen und verabreichte Schmerzmedikation – Pilotphase-1 (Legende in Tab. 8.15.)

Pilotphasen	Tier	Tag nach OP	Grad des Schmerzverhaltens	Lahmheitsgrad	Medikation (Carprofen, Paracetamol) [Carprofen einfache Dosis SD = 4 mg/kg, halbe Dosis HD = 2 mg/kg] [Paracetamol SD 10 mg/kg]	Medikation (Buprenorphine) [einfache Dosis SD = 0.01 mg/kg KGW, doppelte Dosis DD = 0.02 mg/kg KGW]
Phase 2 nicht therapiert	101.03	0	4,00	4,00	Carprofen SD SID	SD QID
		1				-
		2				DD BID
		3				SD TID
		4	3,50	3,50		
		5-8	4,00	4,00	Tag 7/8: Carprofen SD SID	Tag 9/10: SD BID; Tag 11: SD SID
		9-11			Tag 9+10:Carprofen einfache Dosis (4mg/kg BW) (ein Mal/Tag); Tag 11: HD	
		12-14	4,85		Carprofen HD SID	-
		15-17	5,00			
		18-21				
Phase 2 nicht therapiert	101.04	0	4,00	4,00	Carprofen SD SID	SD QID
		1	4,50			-
		2	3,00	3,00		DD BID
		3-4	3,25	3,80		SD TID
		5-6	4,00	4,00	-	
		7-8	3,57	3,00	Carprofen SD SID	SD QID Tag 7 und SD TID Tag 8
		9-13	4,00	4,00	Carprofen SD SID, ab Tag 11 Carprofen HD SID	Tag 9+10: SD BID; Tag 11: SD SID; ab tag 12.: -
		14-15	4,50		Carprofen HD SID	-
		16-18	5,00			
		19-21	4,50		Carprofen HD SID am Tag 19 und 20	

Tabelle 8.13: relevante Auswertungsergebnisse der klinischen Untersuchungen und verabreichte Schmerzmedikation – Pilotphase-2 (Legende in Tab. 8.15.)

Pilotphasen	Tier	Tag nach OP	Grad des Schmerzverhaltens	Lahmheitsgrad	Medikation (Carprofen, Paracetamol) [Carprofen einfache Dosis SD = 4 mg/kg, halbe Dosis HD = 2 mg/kg] [Paracetamol SD 10 mg/kg]	Medikation (Buprenorphine) [einfache Dosis SD = 0.01 mg/kg KGW, doppelte Dosis DD = 0.02 mg/kg KGW]	
Phase 3 therapiert	101.05	0	4,00	4,00	Carprofen SD SID	SD QID	
		1	3,00	3,50		-	
		2	4,00			SD TID	
		3-5		3,33			ab Tag 4.: SD BID
		5-6		3,25			
		7		3,50			
		8		4,00			
		9					
		10-14	5,00	5,00		Carprofen SD SID; ab Tag 16. HD SID	-
		15-18			Carprofen HD SID		
		19-21					
Phase 3 therapiert	101.06	0	4,00	3,00	Carprofen SD SID	SD QID	
		1		4,00		-	
		2				SD TID	
		3-4	3,80				ab Tag 4.: SD BID
		5-6	3,75				
		7-8	4,00				
		9-10	4,25	4,25			SD SID
		11-14		4,13		-	
		15-18	5,00	5,00	Carprofen SD SID; ab Tag 16.: carprofen HD SID		
		19-21			Carprofen HD SID		

Tabelle 8.14: relevante Auswertungsergebnisse der klinischen Untersuchungen und verabreichte Schmerzmedikation – Pilotphase-3 (Legende in Tab. 8.15.)

Lahmheit		Schmerzverhalten		Abkürzung
1	keine Belastung	1	massives Schmerzverhalten	SID - einmal täglich
2	hgr. Lahmheit	2	hgr. Schmerzverhalten	BID - zweimal täglich
3	mgr. Lahmheit	3	mgr. Schmerzverhalten	TID - dreimal täglich
4	ggr. Lahmheit	4	ggr. Schmerzverhalten	
5	keine Lahmheit	5	kein Schmerzverhalten	

Tabelle 8.15: klinische Untersuchung und Medikation – Legende

Pilot-Phase	Tier	Initiales Innokulum	Tibia				Gelenk- Flüssigkeit (KbE/ml)	Femur (BISS)			
			Knochen (KbE/g)	Weichgewebe (KbE/g)	Platte / Schrauben (KbE/ml)	Transducer (KbE/ml)		Knochen (KbE/g)	Weichgewebe (KbE/g)	Platte / Schrauben (KbE/ml)	Transducer (KbE/ml)
1	101.01	2.00E+05	5,56E+03	2,67E+04	1,63E+04	4,00E+04	-	4,44E+04	3,79E+04	1,73E+03	3,07E+04
	101.02	2.00E+05	6,06E+03	2,67E+04	1,08E+04	2,67E+04	1,38E+03	6,67E+04	8,49E+02	8,53E+03	2,13E+04
2	101.03	1.00E+04	3,92E+05	6,20E+03	5,20E+05	6,93E+04	-	-	-	-	-
	101.04	1.00E+04	5,68E+06	6,61E+03	3,73E+05	1,71E+04	-	-	-	-	-
3	101.05	1.00E+04	1,63E+07	3,66E+03	8,80E+04	1,71E+05	-	-	-	-	-
	101.06	1.00E+04	8,58E+06	5,77E+04	1,61E+05	5,47E+04	-	-	-	-	-

Tabelle 8.16: bakterielle Auswertungsergebnisse der entnommenen Proben

Pilotphase (Dauer) ->		Phase 1 (7T)			
Tier Nr. (OP Seite)->		101.01 (li)		101.02 (re)	
Seite ->		li	re	li	re
Struktur- veränderung	Inn poplitei	0	NA	NA	2
	Inn inguinales	1	1	1	1
Entzündungs- reaktion	Inn poplitei	0	NA	NA	2
	Inn inguinales	1	2	1	1
Anwesenheit von Bakterien	Inn poplitei	1	NA	NA	0
	Inn inguinales	0	0	0	0

Tabelle 8.17: Auswertungsergebnisse der poplitealen und inguinalen Lymphknoten Pilotphase-1 (Legende in Tab. 8.20)

Pilotphase (Dauer) ->		Phase 2 (21T)			
Tier Nr. (OP Seite)->		101.03 (li)		101.04 (li)	
Seite ->		li	re	li	re
Struktur- veränderung	Inn poplitei	2	1	1	0
	Inn inguinales	2	1	1	0
Entzündungs- reaktion	Inn poplitei	2	1	0	0
	Inn inguinales	2	1	1	0
Anwesenheit von Bakterien	Inn poplitei	0	0	0	0
	Inn inguinales	0	1	1	1

Tabelle 8.18: Auswertungsergebnisse der poplitealen und inguinalen Lymphknoten Pilotphase-2 (Legende in Tab. 8.20)

Pilotphase (Dauer) ->		Phase 3 (21T)			
Tier Nr. (OP Seite)->		101.05 (li)		101.06 (li)	
Seite ->		li	re	li	re
Struktur- veränderung	Inn poplitei	1	0	1	1
	Inn inguinales	1	0	1	1
Entzündungs- reaktion	Inn poplitei	1	0	1	0
	Inn inguinales	1	1	1	0
Anwesenheit von Bakterien	Inn poplitei	0	0	0	0
	Inn inguinales	0	0	0	0

Tabelle 8.19: Auswertungsergebnisse der poplitealen und inguinalen Lymphknoten Pilotphase-3(Legende in Tab. 8.20)

## MSRU0101 Marvel BC Bewertungstabelle

Bewertung	Strukturveränderungen
0	keine
1	ggr.: Aktivierung von Sekundärfollikeln, vaskuläre Reaktion des Kortex (Dilatation von Blut und/oder Lymphgefäß)
2	mgr.: lokalisierte sekundäre Follikelhyperplasie/follikuläre Depletion (Atrophie)lymphatische Sinusektasie, vaskuläre und medulläre Reaktion von Medulla und Cortex(Dilatation von Blut-und/oder Lymphgefäßen), Makrophagen Hyperplasie (Mantelzone, Sinus)
3	hgr.: gesamtes Organ(Cortex, Paracortex, Medulla): Follikelhyperplasie/follikuläre Depletion (Atropie), lymphatische Sinusektasie, vaskuläre Reaktion von Medulla und Kortex(Dilatation von Blut-und/oder Lymphgefäßen), Makrophagenhyperplasie
Bewertung	Entzündungszellen/Hypersensitivitätsreaktion-Zellen
0	keine
1	ggr. Entzündungsreaktion: fokale/einzeln auftretende Entzündungszellen
2	mgr. Entzündungsreaktion: mehrere/ multifokal auftretende Entzündungszellen
3	hgr. Entzündungsreaktion: hohe Anzahl/ multifokal konfluierende Entzündungszellen
Bewertung	Vorkommen von Bakterien
0	keine
1	geringe Anzahl von Bakterien(einzeln auftretend oder weniger als 2 Kolonien) / fokal / intrazellulär
2	mehrere/ multifokal auftretende Bakterien
3	hohe Anzahl von Bakterien, multifokal bis diffus

Tabelle 8.20: Auswertungsergebnisse der poplitealen und inguinalen Lymphknoten - Legende

Pilotphase ->		Phase 1 (7d)		Phase 2 (21d)		Phase 3 (21d)	
Tier ID->		101.01	101.02	101.03	101.04	101.05	101.06
Seite		links	rechts	links	links	links	links
Akute entzündliche Komponente	Schraubenlöcher Femur	2	2	NA	NA	NA	NA
	Defekt	3	4	4	1	4	4
	Schraubenlöcher Tibia	4	2	4	3	3	4
Zeichen einer chronischen Entzündung	Schraubenlöcher Femur	2	2	NA	NA	NA	NA
	Defekt	1	2	4	4	4	4
	Schraubenlöcher Tibia	2	1	4	4	4	4
Knochennekrose	Schraubenlöcher Femur	3	3	NA	NA	NA	NA
	Defekt	3	4	4	1	4	4
	Schraubenlöcher Tibia	4	3	4	3	4	4
Anwesenheit von Bakterien	Schraubenlöcher Femur	3	3	NA	NA	NA	NA
	Defekt	2	3	2	1	4	3
	Schraubenlöcher Tibia	3	1	2	1	3	3

NA not applicable/nicht durchgeführt

Tabelle 8.21: Auswertungsergebnisse der Knochen Pilotphase 1 bis 3(Legende in Tab. 8.22)

#### MSRU0101 Marvel BC Bewertungstabelle

Bewertung <b>akute entzündliche Komponente</b>	
0	keine
1	ggr.- mgr. Infiltration von neutrophilen Granulozyten ohne intramedullären Abszess
2	mgr.- hgr. Infiltration von neutrophilen Granulozyten ohne intramedullären Abszess
3	ggr.- mgr. Infiltration von neutrophilen Granulozyten mit intramedullären Abszess
4	mgr.- hgr. Infiltration von neutrophilen Granulozyten mit intramedullären Abszess
<b>Anzeichen einer chronischen Entzündung (Lymphknoten und Plasmazellen)</b>	
0	keine
1	ggr.- mgr. chronische Entzündung ohne signifikantes Granulationsgewebe, fibrotische Komponenten
2	mgr.- hgr. chronische Entzündung mit einigem unreifen Granulationsgewebe, fibrotische Komponente
3	ggr.- mgr. chronische Entzündung mit signifikantem Granulationsgewebe, fibrotische Komponente
4	mgr.- hgr. chronische Entzündung mit signifikantem Granulationsgewebe, fibrotischen Komponente
<b>Knochennekrose</b>	
0	keine Anzeichen auf Nekrose
1	einzelne Nekroseherde ohne Sequesterformation
2	multiple Nekroseherde ohne Sequesterformation
3	multiple Nekroseherde mit einzelnen Sequestern
4	multiple Nekroseherde und Sequester
<b>Anwesenheit von Bakterien</b>	
0	keine
1	geringe Anzahl von Bakterien (einzeln auftretend oder weniger als 2 Kolonien)/ fokal
2	gering bis moderat auftretenden Bakterien/ multifokal
3	moderat auftretende Bakterien/multifokal
4	hohe Anzahl von Bakterien/multifokal bis diffus

Tabelle 8.22: Auswertungsergebnisse der Knochen Pilotphase 1 bis 3 - Legende



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg für die Überlassung des Themas und die Betreuung und Korrektur meiner Dissertation. Prof. Dr. von Rechenberg war mir mit ihrem persönlichen Einsatz und umfassenden fachlichen Kenntnissen eine hervorragende Betreuerin.

Ebenso bin ich Dr. Karina Klein, die mir mit Rat und Tat zur Seite stand, und PhD Salim Darwiche für die Betreuung während der Forschungsarbeit und der Durchsicht der Arbeit zu grossem Dank verpflichtet.

Ein grosser Dank gilt PD Dr. Yvonne Achermann und Tiziano Schweizer für die Bereitstellung der Inokula sowie die stets lehrreiche und kooperative Zusammenarbeit. PD Dr. Achermann bin ich sehr dankbar für ihre Bereitschaft, darüber hinaus auch als Korreferentin für meine Arbeit zur Verfügung zu stehen.

Ein Dankeschön gilt ebenfalls Dr. Agnieszka Karol für Ihre Hilfe bei der Herstellung der histologischen Präparate und deren histologischer Auswertung sowie Dr. Dagmar Verdino für die exzellente Durchführung der Allgemeinanästhesien.

Beat Lechmann von DePuy Synthes und Markus Rennich von Magnetodyn danke ich für die Bereitstellung der Produkte und Materialien sowie für die geduldige Zusammenarbeit, steten Input und regen Austausch während der Versuchsphasen.

Dem ganzen MSRU Team möchte ich ebenfalls herzlich Dankeschön sagen. Es war mir eine grosse Freude mit Ihnen zu arbeiten.

Den Tierpflegern des Tierspitals Zürich sowie der Familie Knüsel vom Staffelegghof danke ich für die gute Pflege der Schafe und die stets freundliche Zusammenarbeit.

Mein ganz besonders herzlicher Dank geht an meinen Lebenspartner Peter Zimmerly für die grosse Unterstützung sowie die Geduld während der Forschungszeit. Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Mutter und meinen Schwestern Isabelle und Sara für deren stetige Unterstützung und entgegengebrachte Liebe auf meinem Lebensweg bedanken.

---



## Curriculum Vitae

Vorname Name	Katharina Siwy
Geburtsdatum	11.11.1985
Geburtsort	Herdecke
Nationalität	deutsch

### Schulausbildung

08/1996 – 06/2004	Hildegardis-Gymnasium, Bochum, DE
09/2004 – 06/2006	Matthias-Claudius-Gesamtschule, Bochum, DE

### Höchster Schulabschluss

06/2006	Abitur Matthias-Claudius-Gesamtschule, Bochum, DE
---------	---

### Studium

09/2007 – 06/2010	Veterinärmedizin, Szent István Universität, Budapest, HU
06/2011 – 08/2015	Veterinärmedizin, Veterinärmedizinische Fakultät, Leipzig, DE

08/2015	<b>Abschlussprüfung vet. med.</b> Veterinärmedizinische Fakultät, Leipzig, DE
---------	--

02/2018 – 06/2020	<b>Anfertigung der Dissertation</b> unter Leitung von Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg am Institut für Molekulare Mechanismen und Krankheiten der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich Direktor Prof. Dr. med. vet. phil. II Michael Hottiger
-------------------	--

### fachrelevante Anstellungen nach Abschluss des veterinärmedizinischen Studiums

12/2015 – 12/2017	Assistentztierärztin, Tierarztpraxis Bodenseekreis, DE
seit 11/ 2019	Amtstierärztin, Landratsamt Augsburg, DE

---